

Über die Alkaloidbildung von *Claviceps purpurea* Tulasne in saprophytischer Kultur

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität
zu Mainz

KARL GEORG BÜCHEL

Mainz 1957

Über die Alkaloidbildung von *Claviceps purpurea* TULASNE
in saprophytischer Kultur.

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität
zu Mainz

eingereicht von

K a r l G e o r g B ü c h e l
geboren in Homberg-Niederrhein



Mainz 1957

Dekan:

Prof. Dr. H. Falke

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Rochelmeyer

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Stahl

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 1957

Datum des Diploms 18. Juni 1957

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Rochelmeyer, möchte ich für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Ratschläge und das mir stets zuteilgewordene, wohlwollende Entgegenkommen an dieser Stelle danken.

Für sachliche Unterstützung bin ich der Kali-Chemie A.G., Hannover, zu Dank verpflichtet.

Meinen lieben Eltern !

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung. Der Nachweis der Fähigkeit von <i>Claviceps purpurea</i> zur Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur. Übersicht über die bisher dort aufgefundenen Alkaloide.	1
I. Vergleich der in saprophytischer und parasitischer Kultur gebildeten Alkaloide.	7
II. Über das Vorkommen von <i>Claviceps</i> stämmen, die auf bekannten Nährböden Alkaloid bilden.	12
III. Untersuchungen über geeignete Nährböden.	16
IV. Das Verhalten der alkaloidbildenden Stämme bei wiederholter saprophytischer Kultur.	22
IVa. Versuche zur Stimulation der Alkaloidproduktion durch Aminosäuren.	23
IVb. Kälteeinwirkung als Reiz.	26
IVc. Parasitische Zwischenpassagen als Reiz.	29
V. Diskussion der angewandten Methodik.	33
VI. Entwicklung eines geeigneten chemisch definierten Nährbodens.	37
VIa. Zur Sklerotienbildung in saprophytischer Kultur.	41
VIb. Zur Farbstoffbildung in saprophytischer Kultur.	44
VIc. Die Bedeutung des Glycocoll-Nährbodens.	47
Schlußdiskussion.	51
Zusammenfassung.	53

L.R.Tulasne, O.Brefeld, B.Meyer und C.Engelke (1-4) erkannten bereits, daß der in der Natur parasitisch lebende Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* TULASNE auch zu saprophytischer Lebensweise befähigt ist. Sie verwandten Kulturen des Pilzes auf künstlichen Nährböden, um Einblicke in seine Biologie zu erhalten. C. Engelke (4) erwog darüberhinaus, derartige Kulturen auch zur Gewinnung von Mutterkornalkaloiden heranzuziehen. Er setzte dabei stillschweigend voraus, daß der Pilz bei saprophytischer Lebensweise ebenso Alkaloid bildet. Dieses Problem wurde von zahlreichen Bearbeitern (5-30) aufgegriffen und experimentell untersucht. Während ein Teil von ihnen die Möglichkeit einer Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur verneint, konnte ein anderer Teil sie bis zu einem gewissen Grade wahrscheinlich machen. Ihr Alkaloidnachweis beschränkte sich allerdings auf Farb- und Fällungsreaktionen und physiologische Verfahren. Derartige Nachweismethoden können aber nicht als eindeutig angesehen werden. Zu fordern ist die Isolierung der Mutterkornalkaloide aus solchen Kulturen und ihre Charakterisierung auf chemischen und physikalischem Wege, worauf H.Rochelmeyer bereits nachdrücklich hingewiesen hat (31).

Dieses gelang erstmals M.Abe und Mitarbeitern (39). Sie isolierten aus den saprophytischen Kulturen eines auf *Elymus mollis* Trin. parasitierenden *Clavicep*stypes neben bis dahin unbekannten Leitalkaloiden Ergokryptin, Ergokryptinin und Ergosinin.

H.Raßbach (32) gelang es, die therapeutisch wichtigen Alkaloide Ergotamin und Ergocristin bzw. ihre Stereoisomeren aus saprophytischen Kulturen zweier *Clavicep*stypen kristallin zu erhalten, die auf Roggen bzw. auf einer *Holcus*-Art parasitierten. Im gleichen Arbeitskreis war es einige Zeit später möglich, auch noch Ergometrin in reiner Form aus saprophytischen Kulturen zu fassen (33).

Da H.Raßbach bereits die hier in Betracht zu ziehenden Arbeiten eingehend referiert hat (32), sollen im folgenden neben neu hinzugekommenen Veröffentlichungen die Arbeiten von M.Abe und Mitarbeitern zusammenfassend besprochen werden.

M.Abe und Mitarbeiter (34-51) untersuchten etwa 500 *Clavi-*

cepstypen des ostasiatischen Bereiches, hauptsächlich solche, die auf Gräsern parasitieren. Dabei fanden sie eine Reihe neuer wasserlöslicher Alkaloide auf, deren Struktur sie aufklärten. Die Alkaloide fanden sich sowohl in den Sklerotien als auch den saprophytischen Kulturen der auf *Agropyrum semicostatum*, *Agropyrum ciliare*, *Trisetum bifidum*, *Elymus mollis*, *Festuca rubra*, *Phragmites*- und *Phalaris*-arten parasitierenden Pilzstämmen. Sie stellen keine Lysergsäurederivate dar, sondern leiten sich von deren Reduktionsprodukten, dem 8-Methylergolen und dem 8-Oxymethylergolen ab.

Zwei weitere Alkaloide dieser Reihe wurden von A. Stoll und Mitarbeitern (52,50) aufgefunden, eines davon in den Sklerotien und saprophytischen Kulturen eines auf *Pennisetum typhoideum* parasitierenden *Clavicepstypen*. Sie klärten auch ihre Struktur auf (53).

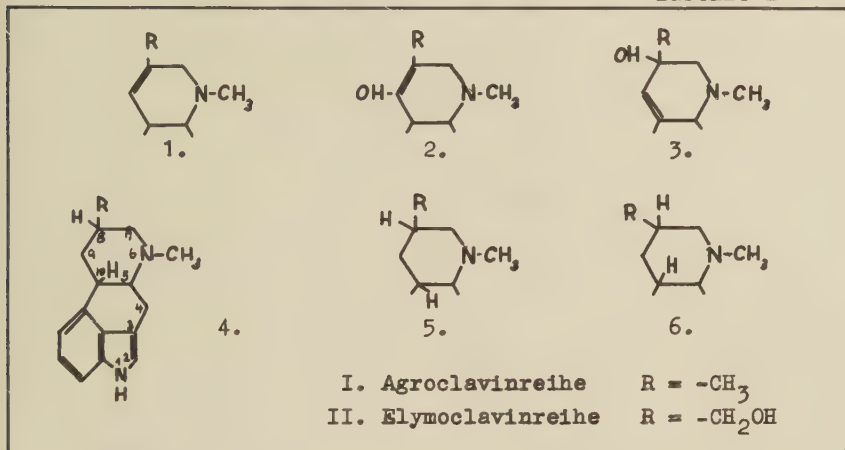
Die Alkaloide lassen sich nach der Oxydationsstufe ihres C₈- Substituenten in folgende zwei Reihen einteilen:

Tabelle 1

	Trivialname	Autor
I. 8-Methylergolen-Derivate		
1. 6,8-Dimethyl- Δ^8 -ergolen	Agroclavin	Abe
2. 6,8-Dimethyl- Δ^8 -ergolen-01-(9)	Isosetoclavin	Stoll
3. 6,8-Dimethyl- Δ^9 -ergolen-01-(8)	Triseclavin	Abe
4. α -6,8-Dimethylergolin (I)	Festoclavin	Abe
5. α -6,8-Dimethylergolin (II)	Costaclavin	Abe
6. β -6,8-Dimethylergolin (I)	Pyroclavin	Abe
II. 8-Oxymethylergolen-Derivate		
1. 6-Methyl-8-oxymethyl- Δ^8 -ergolen	Elymoclavin	Abe
2. 6-Methyl-8-oxymethyl- Δ^8 -ergolen-01-(9)	Molliclavin	Abe
3. 6-Methyl-8-oxymethyl- Δ^9 -ergolen-01-(8)	Penniclavin	Stoll
4. α -6-Methyl-8-oxymethylergolin (I)	Secaclavin	Abe

Die Strukturen werden durch folgendes Formelschema wiedergegeben:

Tabelle 2



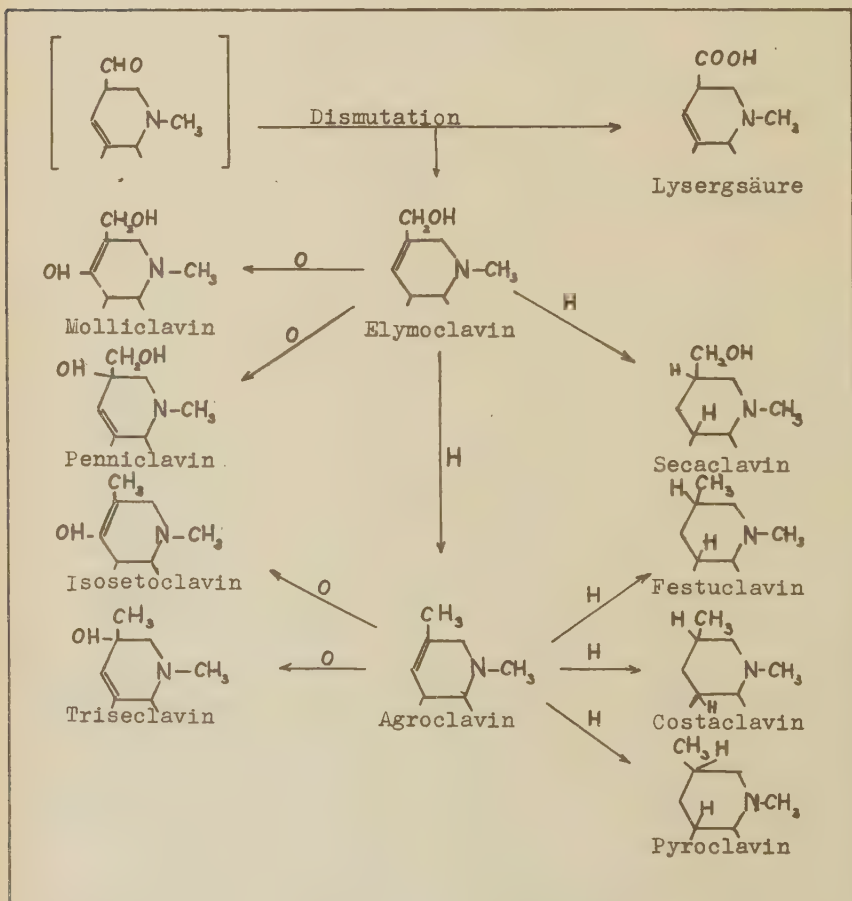
Die auffällige strukturelle Ähnlichkeit der bisher genannten Alkaloide und ihr gleichzeitiges Auftreten bei beiden Kulturarten der oben aufgeführten Stämme (45), führen M.Abe zu bestimmten Vorstellungen über den Verlauf der Alkaloidbiosynthese, bei der die einzelnen Alkaloide durch Umwandlung ineinander entstehen sollen. Da sie sich untereinander und von der Lysergsäure im Wesentlichen durch die Oxydationsstufe unterscheiden, würden diese Umwandlungen Vorgänge darstellen, zu denen analoge biochemische Reaktionen bekannt sind. Die Hypothese lässt allerdings offen, warum ein großer Teil der Claviceps-typen nur Lysergsäurederivate bildet, und die von ihm beschriebenen Alkaloide dort nicht aufgefunden wurden.

Als gemeinsame Vorstufe der Biosynthese nimmt M.Abe 6-Methyl- Δ^9 -ergolenyl-8-methanal an. Dieses soll dann in Lysergsäure und 6-Methyl-8-oxymethyl- Δ^8 -ergolen = Elymoclavin disproportionieren. Analoge Umsetzungen können bei der Hefe und bei höheren Pflanzen durch eine Aldehydmutase ausgelöst werden. Ein Teil des Elymoclavins wird nach seiner Auffassung zum 6,8-Dimethyl- Δ^8 -ergolen reduziert, dem Agroclavin. Durch Hydrierungsvorgänge sollen Festuclavin und seine Stereoisomeren

Costaclavin und Pyroclavin, bzw. in der Elymoclavinreihe Secaclavin entstehen. Durch oxydative bzw. dehydrierende Vorgänge könnten in C₈ und in C₉-Stellung Hydroxylgruppen eingeführt werden, die zu Triseclavin und Isoetoclavin, bzw. zu Penniclavon und Molliclavon führten.

Das folgende Formelschema gibt den hypothetischen Biosynthesablauf nach M.Abe (44) (erweitert) wieder:

Tabelle 3



M.Abe war es möglich, die einzelnen Alkaloide auf chemischem Wege ineinander zu überführen (50-51). So erhielt er z.B. durch Chromsäureoxydation aus Agroclavin Triseclavin, durch katalytische Hydrierung Festuclavin. Wenn auch die Hypothese von M.Abe noch nicht als bewiesen gelten kann, so gibt sie doch wertvolle Anregungen zum Studium der Zusammenhänge der Alkaloidbildung. Sie zeigt vor allem, welche Variationsmöglichkeiten der Pilzorganismus bei der Bildung der Alkaloide hat.

Überblickt man die seit 1950 erschienenen Arbeiten, so ersieht man, daß aus jeder Gruppe der bisher bekannten Mutterkornalkaloide die Hauptvertreter auch in saprophytischer Kultur aufgefunden worden sind.

Tabelle 4

Wasserlösliche Alkaloide:	Ergometrin	
Wasserunlösliche Alkaloide:		
Ergotamin-Gruppe:	Ergotamin	Ergotaminin Ergosinin
Ergotoxin-Gruppe:	Ergocristin	Ergocristinin
	Ergokryptin	Ergokryptinin

Damit ist bewiesen, daß der Mutterkornpilz auch in saprophytischer Kultur die typischen Mutterkornalkaloide bilden kann. Dabei wurde weiter die Erkenntnis gewonnen, daß eine Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur nur bei Verwendung bestimmter Clavicepstypen ¹⁾ gelingt. So fand M.Abe (34) unter 500 untersuchten Stämmen nur 16 alkaloidbildende Rassen, von denen 11 nach seiner Aussage nur Spuren von Alkaloid bildeten. Ebenso fand H.Raßbach unter etwa 100 untersuchten Stämmen nur vier, die in saprophytischer Kultur Alkaloid bildeten. Hierin ist auch der Grund zu suchen, warum eine Reihe von Bearbeitern in den saprophytischen Kulturen von Claviceps keine Al-

1) Die Begriffe "Typ" und "Stamm" werden hier und in der vorliegenden Literatur gleichwertig und ungeachtet ihrer Bedeutung in der Botanik gebraucht. Es handelt sich dabei um Abimpfungen von einzelnen Sklerotien, ihre genetische Zusammensetzung ist nicht bekannt.

kaloidbildung nachweisen konnten, sie gingen bei ihren Untersuchungen von ungeeigneten Clavicepstypen aus. Bei der parasitischen Kultur wird die Fähigkeit zur Bildung bestimmter Alkaloide als eine genetisch fixierte Stammeseigenschaft angesehen (54), die auch bei Wirtswechsel erhalten bleibt (55). Ungeklärt ist die Frage, ob die Fähigkeit auch bei saprophytischer Kultur beibehalten wird. Sie war durch Vergleich der bei parasitischer und saprophytischer Kultur gebildeten Alkaloide zu überprüfen. Dazu war es notwendig, eine Reihe von geeigneten Stämmen zu finden. Nach der vorliegenden Literatur sind diese relativ selten und machen die eingehende Untersuchung einer großen Anzahl von Clavicepstypen erforderlich (32,34). Die Lösung des Problems war vor allem dadurch erschwert, daß bisher kein Nährboden vorlag, der für alle Clavicepstypen geeignet erschien. Die Alkaloidbildung erwies sich nach H.Raßbach nicht nur abhängig von den erblichen Anlagen, sondern auch vom Nährboden (32). Er zeigte, daß der von ihm zu Reihenuntersuchungen verwandte Clavicepstyp K 90 nur bei bestimmten Peptonchargen Alkaloid bildete. Daher war die Verwendung einer chemisch definierten Stickstoffquelle anzustreben. Die Alkaloidbildung ist nach H.Raßbach von weiteren Faktoren abhängig, die noch aufzuklären sind. So erhielt er z.B. stark unterschiedliche hohe Alkaloidausbeuten bei Verwendung des gleichen Nährbodens und des gleichen Stammes, und die Alkaloidproduktion schien bei fortlaufender saprophytischer Züchtung nachzulassen.

I. Vergleich der in saprophytischer und parasitischer Kultur gebildeten Alkaloide.

Zunächst war die Annahme zu überprüfen, ob die einzelnen Stämme sowohl in parasitischer als auch bei saprophytischer Kultur die gleichen Alkaloide bilden. Hierzu wurde eine Reihe von Stämmen, die in saprophytischer Kultur Alkaloid bilden, in der Vegetationsperiode 1955 auf Versuchsfeldern angebaut. Um dafür ein gleichmäßiges Impfmateriale zu erhalten, wurden von jedem verwandten Stamm eine größere Anzahl von Schrägagarkulturen hergestellt, die jeweils von einer Ausgangskultur abstammten. Mit Konidienaufschwemmungen des einen Teils dieser Kulturen wurde Roggen auf Parzellen von je 100 m² infiziert, der andere Teil diente zur Anlage von saprophytischen Kulturen mit Glycocoll-Nährlösung.

Die aus den Feldkulturen erhaltenen Sklerotien und die saprophytischen Kulturen zeigten folgende Alkaloidgehalte:

Tabelle 5

Stamm	Nährboden	Kulturdauer	Durchschnittlicher		Alkaloidgehalt in %		
			saprophytisch Kulturfiltrat	Mycel	parasitisch	1952	1954 1955
WD 006	Glycocoll	41 ^d	0,4 mg%	pos.		0,63	0,56
WD 020	"	43 ^d	0,6 "	neg.		0,81	0,58
WD 091	"	43 ^d	0,7 "	pos.		0,87	0,35
WD 198	"	40 ^d	0,9 "	0,05		0,89	0,56
WD 1487	"	42 ^d	5,8 "	0,14		0,86	0,65
WD 1517	"	42 ^d	2,0 "	0,06		0,78	0,51
WD 1608	"	42 ^d	1,3 "	0,02		0,79	0,71

Die in den saprophytischen Kulturen des Stammes WD 198 gebildeten Alkaloide wurden durch Isolierung identifiziert. In einer kleinen Versuchsreihe wiesen Kulturen des Stammes auf Glycocoll-Nährlösung einen hohen Alkaloidgehalt von 10 mg pro Kolben auf. Bei einer daraufhin angelegten größeren Versuchsreihe blieb die Ausbeute an Rohalkaloidgemisch von 220 mg mit einem Durchschnittswert von 1,34 mg pro Kolben weit hinter der Erwartung zurück. In einer nochmals angelegten Versuchsreihe wurde mit 1,57 mg

pro Kolben kein höherer Alkaloidgehalt erzielt, die Ausbeute an Rohalkaloidgemisch betrug insgesamt nur weitere 189 mg. Die Rohalkaloidgemische wurden chromatographisch über eine kurze Aluminiumoxydsäule gereinigt. Bei der Elution mit Methylenchlorid lief vorweg eine im ultravioletten Licht blau fluoreszierende Zone, deren Eluat weder mit dem Reagens nach H.W. van Urk (56), noch dem nach Mayer eine positive Reaktion ergab. Die zweite ebenso fluoreszierende Zone enthielt dagegen Alkaloid. Aus dem in Methanol gelösten Verdunstungsrückstand des Eluats kristallisierten fünfeckige Platten vom Schmelzpunkt $220 - 224^{\circ}$ (unter Zersetzung) aus.

Die Substanzen wurden weiter chromatographisch getrennt. Die erste Alkaloidfraktion beider Versuchsreihen kristallisierte aus Aceton in dreieckigen, aus Methanol in fünfeckigen Platten vom Schmelzpunkt 231° bzw. 224° (unter Zersetzung) aus. Ihre spezifische Drehung in Chloroform betrug $[\alpha]_D^{20} = +355^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_D^{20} = +342^{\circ}$. Diese Daten und die Kristallbilder entsprechen denen des Ergotamins, dieser Befund konnte durch eine papierchromatographische Untersuchung der Fraktion nach K.Macek (57) bestätigt werden.

Die zweite Fraktion beider Versuchsreihen konnte aus Aceton und Methanol nicht zur Kristallisation gebracht werden. Die papierchromatographische Untersuchung ergab Ergotamin und Ergotaminin.

Einerseits konnte mit dieser Untersuchung an einem anderen Clavicepsstamm das Ergebnis von H.Raßbach (32) erhärtet werden, daß Claviceps purpurea auch in saprophytischer Kultur zur Alkaloidbildung befähigt ist, andererseits diente das vorliegende Ergebnis zum Vergleich der bei beiden Kulturarten gebildeten Alkaloide.

Während die in den saprophytischen Kulturen des Stammes WD 198 gebildeten Alkaloide durch Isolierung identifiziert wurden, erfolgte im folgenden der Vergleich der in saprophytischer und in parasitischer Kultur gebildeten Alkaloide papierchromatographisch nach der Methode von K.Macek (57). Um eventuelle Aufspaltungserscheinungen und Fremdinfectionen der einzelnen Stämme zu erkennen, wurde eine größere Anzahl von Sklerotien einzeln untersucht. Im Einzelnen wurde so vorgegangen, daß von den auf jeder Parzelle geernteten Sklerotien 20 zur Analyse verwendet wurden, ohne eine Auswahl nach Größe, Form und Gewicht zu treffen.

Jedes Sklerotium wurde einzeln aufgearbeitet, und seine Alkaloide papierchromatographisch bestimmt. Weiter wurde eine Durchschnittsprobe von 20 g Sklerotien auf ihren Alkaloidgehalt und ihre Einzelalkaloide untersucht. Die vergleichsweise von jedem Stamm angelegten saprophytischen Kulturen wurden in gleicher Weise analysiert. Dabei wurden die Mycelien und die entsprechenden Kulturfiltrate getrennt aufgearbeitet und ein aliquoter Teil der Extrakte verwandt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6

Stamm	Sklerotium parasitisch	Mycel saprophytisch	Kulturfiltrat saprophytisch
WD 006	Ergotamin Ergotaminin Ergocristin Ergocristinin ⁺ Ergokryptin Ergokryptinin ⁺		Ergotamin Ergotaminin
WD 020	Ergotamin Ergotaminin ⁺ Ergocristin Ergokryptin		Ergotamin Ergotaminin Ergocristin ⁺ Ergokryptin
WD 091	Ergotamin Ergotaminin Ergocristin ⁺ Ergokryptin ⁺		Ergotamin Ergokryptin Ergokryptinin ⁺
WD 198	Ergotamin Ergotaminin	Ergotamin Ergotaminin	Ergotamin Ergotaminin Ergosin ⁺

Stamm	Sklerotium parasitisch	Mycel saprophytisch	Kulturfiltrat saprophytisch
WD 1487	Ergotamin Ergotaminin Ergocristin	Ergotamin Ergotaminin Ergokryptin Ergokryptinin	Ergotamin Ergotaminin Ergokryptin Ergokryptinin
WD 1517	Ergotamin Ergotaminin Ergocristin Ergocristinin Ergokryptin Ergokryptinin	Ergotamin Ergotaminin ⁺ Ergocristin Ergocristinin Ergokryptin Ergokryptinin	Ergotamin Ergotaminin Ergocristin Ergocristinin Ergokryptin Ergokryptinin
WD 1608	Ergotamin Ergotaminin ⁺ Ergosin ⁺ Ergocristin Ergokryptin	Ergotamin ⁺ Ergosin ⁺ Ergosinin ⁺ Ergocristin Ergocristinin Ergokryptin Ergokryptinin	Ergotamin ⁺ Ergosin ⁺ Ergocristin Ergocristinin Ergokryptin Ergokryptinin

+ = Spuren

Tabelle 6. Papierchromatographischer Vergleich der in parasitischen und saprophytischen Kultur gebildeten Alkaloide.

Aus Tabelle 6 ersieht man, daß im Allgemeinen in saprophytischer Kultur die Alkaloide gebildet werden, die auch in den parasitischen Sklerotien vorkommen. Quantitativen Unterschieden zwischen rechts- und linksdrehenden Alkaloiden maß ich keine Bedeutung zu, weil dies auf Umlagerungen in der Flüssigkultur und bei der Aufarbeitung zurückzuführen sein kann. Die in manchen Fällen geringe Alkaloidproduktion in

saprophytischer Kultur (WD 006 und WD 091) läßt daran denken, daß die Alkaloide Ergocristin und Ergokryptin zwar vorliegen, aber nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Einer weiteren Untersuchung bedarf das Vorkommen von Ergokryptin in der saprophytischen Kultur von WD 1487.

Die Ergebnisse machen es bei der durch die Methode gegebenen Möglichkeiten wahrscheinlich, daß das Merkmal der Alkaloidspezifität auch in saprophytischer Kultur weitgehend erhalten bleibt. Die gleichartige Alkaloidbildung war nun auch quantitativ zu überprüfen.

Für die parasitische Kultur hat G.Kessler (58) festgestellt, daß bei den von ihm untersuchten Stämmen sich die Mengenverhältnisse der Alkaloide untereinander bei wiederholtem Anbau und Selektionierung der alkaloidreichsten Sklerotien nicht wesentlich verschoben. Die quantitative Zusammensetzung des Alkaloidgemisches muß daher ebenfalls als eine Stammeseigenschaft angesehen werden. Bei den Untersuchungen über das Vorkommen von Ergometrin in saprophytischen Kulturen (33) wurde auch die quantitative Zusammensetzung des Alkaloidgemisches untersucht. Die qualitative Zusammensetzung des dabei verwandten Stammes K 90 war von H.Raßbach (32) überprüft worden. Bei einer Versuchsreihe des Stammes mit Glycocol-Nährböden erhielt ich aus dem Mycel 610 mg Rohalkaloidgemisch, aus dem säulenchromatographisch 31 mg (= 5,1 %) Ergometrin isoliert werden konnten. Auf gleiche Weise wurden aus den 320 mg Rohalkaloidgemisch des Kulturfiltrates 14 mg (= 4,5 %) Ergometrin abgetrennt. Dieses Verhältnis der wasserlöslichen zur wasserlöslichen Alkaloidfraktion wurde auch bei parasitischer Kultur gefunden (33).

Während die Ernährung zwar auf die Höhe der Alkaloidbildung einen wesentlichen Einfluß hat, scheint die qualitative Zusammensetzung der Alkaloide davon nicht berührt zu werden. Wie bereits auf Seite 5 erwähnt, muß angenommen werden, daß das oder die Gene, die die Voraussetzungen zur Bildung eines bestimmten Alkaloids in parasitischer Kultur schaffen, die Funktion auch in saprophytischer Kultur beibehalten. Das bedeutet, daß bei gegebenen Erbanlagen die Alkaloidbildung

eines bestimmten Stammes bei beiden Kulturarten gleichartig sein wird, und jeder in parasitischer Kultur alkaloidbildende Stamm grundsätzlich auch zur Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur befähigt sein müsste. Es erklärt die Tatsache, daß in parasitischer Kultur alkaloidfreie Stämme in saprophytischer Kultur kein Alkaloid zu bilden vermögen.

Die erblichen Anlagen stellen allerdings nur eine der Voraussetzungen für die Alkaloidbildung dar. Von gleicher Wichtigkeit für die Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur ist die Zusammensetzung des Nährbodens. Durch die Untersuchungen von H.Raßbach (32), H.D.Michener u. N.Snell (17) und L.Niedermaier (22) ist bekannt, daß zahlreiche der von ihnen untersuchten Stämme die genetischen Voraussetzungen zwar besaßen, sie aber dennoch in saprophytischer Kultur kein Alkaloid bildeten. Daraus ergab sich für mich die Aufgabe, die Nährstoffansprüche von *Claviceps purpurea* weiter zu studieren, um Kulturbedingungen aufzufinden, bei denen ein hoher Prozentsatz befähigter Stämme Alkaloid zu bilden vermag. Die Brauchbarkeit eines als geeignet erscheinenden Nährbodens mußte dann an Hand eines umfangreichen Materials an *Claviceps*stämmen geprüft werden. Die Eignung eines bestimmten Nährbodens für einen bestimmten Stamm kann nach den Ergebnissen von H.Raßbach (32) nicht verallgemeinert werden. Der von ihm verwandte Nährboden mit Pepton der Charge 38 073 war für die Stämme K 90 und Ho gut geeignet, für etwa 100 andere Stämme aber nicht.

II. Über das Vorkommen von *Claviceps*stämmen, die auf bekannten Nährböden Alkaloid bilden.

Um die angeführten Kulturbedingungen auffinden zu können, mußte eine Reihe von Stämmen zur Verfügung stehen, die nachweislich in saprophytischer Kultur Alkaloide bilden können. Ich konnte sie zunächst nur dadurch erhalten, daß ich eine große Anzahl in parasitischer Kultur Alkaloid bildender Stämme an Hand von literaturbekannten Nährböden auf ihre Eignung untersuchte. Mit den von mir ausgewählten Nährböden waren

von den Autoren (8,11,32,36) bereits gewisse Erfolge erzielt worden. Wenn sie sich auch nicht verallgemeinern lassen, so boten sie doch nach dem damaligen Stand die größte Aussicht auf Erfolg. Andererseits mußte auch in Kauf genommen werden, daß sie teilweise oder völlig ungeeignet für das vorliegende Material an Clavicepsstämmen sein könnten, und bei der Art des Vorgehens zur Alkaloidbildung befähigte Stämme übersehen würden.

Bei den Untersuchungen wurde jede Abimpfung auf vier verschiedenen Nährböden kultiviert. Einmal handelte es sich um die Pepton-Nährlösung nach R.Jaretsky (11). Dabei wurde ein Pepton der Charge 38 073 verwandt, hiermit hatte H.Raßbach (32) bei den Stämmen K 90 und Ho erfolgreiche Alkaloidproduktion erzielt. Weiter wurde eine Asparagin-Nährlösung nach R.Jaretsky (11) herangezogen. Sie hatte sich bei seinen Untersuchungen und bei denen von H.Raßbach (32) bewährt. Außerdem wurde die von M.Abe erfolgreich verwendete Ammoniumsuccinat-Mannit-Nährlösung (36) eingesetzt. Vergleichsweise wurde noch die Nährlösung nach H.Kirchhoff (8) mit rein anorganischen Stickstoffquellen und Dextrose verwandt.

Die Anlage der Kulturen, die Sterilisation und die Beimpfung erfolgte nach Methoden, die in unserem Arbeitskreis von H.Raßbach (32) entwickelt worden sind. Die Abernte der Kolbenkulturen erfolgte nach etwa 40 Tagen Kulturdauer, dieser Zeitpunkt war durch ansteigenden P_H -Wert und abgesunkene Dichte des Kulturfiltrates gegeben. Die Bestimmung des Alkaloidgehaltes erfolgte nach der ebendort (32) beschriebenen Methode. Als qualitativer Nachweis diente die Blaufärbung mit dem Reagens nach H.W. van Urk (56), gleichzeitig wurde mit Mayers Reagens allgemein auf die Anwesenheit von Alkaloiden geprüft; denn einige Mutterkornalkaloide wie Penniclavine (46), Triseclavine (46), Molliclavine (49) und Isosetoclavine (50) reagieren mit dem Reagens nach H.W. van Urk nicht unter Blau-, sondern unter Grünfärbung. Die quantitative Bestimmung erfolgte durch Photometrie der bei der van Urk'schen Reaktion entstandenen blauen Farbe, die dabei erhaltenen Extinktionswerte wurden einheitlich auf Ergotamin umgerechnet. Die in den folgenden Tabellen angegebenen Alkaloidgehalte geben, wenn nicht anders vermerkt, die Summe der in

Mycel und Kulturfiltrat einer 300 ml-Kolbenkultur mit 85 ml Nährlösung enthaltenen Alkaloidmenge wieder.

Die Ausgangssklerotien, von denen die 210 untersuchten Clavicepsstämme abgeimpft worden waren, stammten zum Teil von Wildgräsern wie *Agropyrum repens*, *Agrostis canina*, *Bromus erectus*, *Dactylis glomerata*, *Elymus europaeus*, *Festuca elatior*, *Holcus*-Arten, *Lolium perenne* und *Molinia coerulea*. Sie wurden in den Gebieten der Wertach, der Ammer, am Tegernsee, im Taunus, im Hunsrück und im Münsterland gefunden. Ein anderer Teil stammte von Gerste aus Columbien und von Weizen der deutschen Alpengebiete und des Mainzer Beckens. Und endlich von Mutterkorn auf Roggen aus Wildvorkommen und parasitischen Kulturen des Allgäus, des Mainzer Beckens, Ungarns, der Schweiz, Portugals und mit Getreidelieferungen der USA eingeschlepptes Mutterkorn. Die Sklerotien führten alle Alkaloid und entstammten den Vegetationsperioden 1952 bis 1954.

Nur 12 der 210 Stämme, die im experimentellen Teil der Arbeit aufgeführt sind, vermochten sowohl in parasitischer als auch in saprophytischer Kultur Alkaloid zu bilden. Sie sind in Tabelle 7 aufgeführt.

An Hand der Tabelle 7 sei im Folgenden das Alkaloidbildungsvermögen der Stämme auf den einzelnen Nährböden betrachtet.

Das von mir untersuchte Material an Clavicepsstämmen ist m.E. umfangreich genug, um aussagen zu können, daß rein anorganische Stickstoffquellen in Form von Nitrat und Ammoniumsalzen bei Dextrose als Kohlenstoffquelle als Nährboden ungeeignet sind. Hier wurde ein sehr schlechtes Wachstum und häufiges Untersinken des Mycels beobachtet. Der Nährboden war nicht in der Lage, die während des Kulturprozesses gebildete Säure abzupuffern. Die Endacidität des Kulturfiltrates lag bei den P_H -Werten 4,0 - 4,8. Nach den Untersuchungen von G.Krebs (12) kann damit das schlechte Wachstum erklärt werden.

Bei den vorliegenden Untersuchungen bildete kein Stamm, der von Mutterkorn auf Roggen abgeimpft wurde, auf Pepton-Nährlösungen Alkaloid. Lediglich einige Abimpfungen von

Stamm	Wirtspflanze	Fundort	Jahr	parasit. Alkaloid gehalt	Durchschnittlicher Alkaloidgehalt pro Kolben bei folgendem Nährboden:			
					Anorg.N Dextrose	Pepton- Dextrose	Asparagin Dextrose	Ammonsucc. Mannit
Col 9	Hordeum sativum	Columbien	1953	pos.	0	0	0,91 mg	0
Fe/Fe	Festuca elatior	Tegerensee	1952	0,1 %	0	0	0,30 mg	0,02 mg
El	Elymus europaeus	Wertach	1952	0,47 %	0	0	0,60 mg	0
Mo/T	Molinia coerulea	Taunus	1952	1,05 %	0	0,70 mg	0,54 mg	0,26 mg
Mol 12	Molinia coerulea	Gemen	1953	1,25 %	0	0,63 mg	0	0
Mol 16	Molinia coerulea	Gemen	1953	1,25 %	0	2,02 mg	0	0
Mol 20	Molinia coerulea	Gemen	1953	1,25 %	0	0	0	0,17 mg
3a/10	Secale cereale	Schweiz	1952	0,86 %	0	0	0,36 mg	0
M 5001	Secale cereale	Ambau Mainz	1954	0,74 %	0	0	0,37 mg	0
U 009	Secale cereale	Ungarn	1953	1,02 %	0	0	0	0,14 mg
6014	Secale cereale	Ungarn	1953	1,13 %	0	0	0,80 mg	0
6060	Secale cereale	Ungarn	1953	1,05 %	0	0	0,42 mg	0

Tabelle 7. Die unter 210 untersuchten, in saprophytischer Kultur Alkaloid bildenden Stämme.

Mutterkorn auf *Molinia* sprachen positiv an. Dieses Ergebnis stimmt in der Häufigkeit mit dem Befund von H. Raßbach (32) überein, der bei etwa 100 Stämmen auf dem gleichen Nährboden nur vier Alkaloidbildner fand.

Auch die 8 auf Asparagin-Nährböden alkaloidproduzierenden Stämme entsprechen zahlenmäßig diesem Rahmen.

Bei den Kulturen mit Ammoniumsuccinat-Mannit-Nährböden trat nur in vier Fällen Alkaloidbildung ein. Das entspricht dem Befund von M. Abé (34), der unter etwa 500 untersuchten Stämmen nur 16 alkaloidproduzierende Rassen fand, von denen er 11 sogar als "productive of just a trace" bezeichnet.

Eine Erklärung, warum nur ein so geringer Prozentsatz der Stämme in der Lage ist, auf den verwendeten Nährböden Alkaloid zu bilden, wäre, daß die Nährböden nicht die notwendigen stofflichen Voraussetzungen für die Alkaloidbiosynthese geben. Abgesehen vom Nährboden mit anorganischer Stickstoffquelle, ermöglichen sie dem Pilz lediglich ein gutes Wachstum. Welche Faktoren für die Alkaloidbildung maßgebend sind, muß zunächst offen bleiben. Für die Bearbeitung des vorliegenden Problems war es von Bedeutung, daß durch die vorstehenden Untersuchungen eine Reihe von Stämmen (Tabelle 7) zur Verfügung stand, die in saprophytischer Kultur Alkaloid bildeten. Damit war die Voraussetzung geschaffen, die zur Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur geeigneten Bedingungen zu ermitteln.

III. Untersuchungen über geeignete Nährböden.

Zunächst wurden verschiedene Stickstoffverbindungen auf ihre Brauchbarkeit zur Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur untersucht. Einmal erschien es möglich, daß der Pilz zur Alkaloidbildung einer bestimmten Stickstoffverbindung bedurfte, die er leicht aufnehmen kann und aus der er lediglich den Stickstoff assimiliert. Andererseits konnten Stickstoffverbindungen notwendig sein, die auf Grund ihrer Struktur Vorstufen der Alkaloidbiosynthese darstellen können, wie es V.E. Tyler und A.E. Schwarting (26) und G. Gjerstad und E. Ramstad (30) diskutieren. Endlich lag es nahe, daß beide Forderungen erfüllt sein müßten.

Die von H.Raßbach (32) festgestellte unterschiedliche Eignung verschiedener Peptonsorten machte es wahrscheinlich, daß bestimmte Aminosäurekombinationen erforderlich sein könnten. Es war daher naheliegend, pflanzliche Aminosäuregemische zu verwenden. Aus der Kleberfraktion des Roggens wurde Gliadin isoliert (59), und einmal durch Säurehydrolyse in seine Aminosäuren zerlegt und damit weitgehend wasserlöslich gemacht, ein anderer Teil tryptisch abgebaut. Die Abbauprodukte wurden jeweils anstelle des Peptons in gleicher Konzentration den Nährlösungen zugegeben. Weder bei Verwendung des tryptisch, noch des säurehydrolytisch abgebauten Gliadins konnte Alkaloidbildung beobachtet werden.

Ebenso wurde Honigtau, über dessen Zusammensetzung L.Fuchs und M.Pöhm (88) berichteten, auf seine Eignung als Nährboden mit zwei Stämmen-WD 198 und Fe/Te 1954 - untersucht, die in saprophytischer Kultur Alkaloid zu bilden vermochten. Der Honigtau wurde mit Wasser auf eine Zuckerkonzentration von etwa 10 % verdünnt, teils keimfrei filtriert und teils heiß-sterilisiert. Der Pilz zeigte darauf nicht nur schlechtes Wachstum, sondern auch keine Alkaloidproduktion. Versuche mit Bierwürze bei den vorgenannten Stämmen ergaben zwar gutes Mycelwachstum, aber Alkaloide konnten nicht nachgewiesen werden.

Da nach den Ergebnissen von H.Raßbach (32) die Alkaloidbildung von Stamm K 90 auf Nährböden mit bestimmten Peptonchargen beschränkt blieb, war es mein Bestreben, möglichst chemisch definierte Stickstoffquellen zu verwenden, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. So wurden Harnstoff, Ammoniumpyruvat, Glycocoll, Sarkosin, Natriumglutamat, D,L-Serin, L(-)-Leucin und Kombinationen dieser Stoffe untereinander und mit den vier erwähnten Standardnährböden auf ihre Eignung untersucht. In diesen Versuchsreihen konnte kein Alkaloid nachgewiesen werden.

Einmal kann hieraus der Schluß gezogen werden, daß diese Verbindungen grundsätzlich nicht als Stickstoffquellen für die Alkaloidsynthese geeignet sind. Andererseits erscheint es aber auch möglich, daß einige unter ihnen durchaus brauchbar sind, der Alkaloidstoffwechsel aber trotz ihres Vorhandenseins

zum Erliegen kommt, weil noch andere unbekannte Zusatzfaktoren fehlen.

Bei parasitischer Kultur darf eine ausreichende Versorgung des Pilzes mit Spurenelementen durch den Säftestrom der Wirtspflanze angenommen werden. Sie schien bei den angeführten Nährböden mit meist synthetischen Bestandteilen ungenügend zu sein. Zwar können die zur Kultur verwandten Kolben aus Jenaer Geräteglas 20 ebenfalls eine Spurenelementquelle sein; z.B. eluiert *Aspergillus niger* bei Kaliummangel dies neben Calcium aus der Glaswand (Rippel-Baldes, 60). Ebenso kann das aus organischem Material stammende Pepton und die Dextrose Spurenelemente enthalten. Ob aber die optimale Versorgung damit erreicht wird, ist fraglich. Einen gewissen Aufschluß kann die Zusammensetzung der Sklerotienasche geben. Nach Untersuchungen unseres Arbeitskreises (32) enthielt sie Titan, Kupfer, Aluminium, Eisen, Phosphor, Mangan, Silicium, Calcium, Magnesium, Kalium und Natrium. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß nur ein Teil der aufgefundenen Elemente notwendig ist. Sicher werden nur manche infolge ihrer chemischen und physikalischen Verwandtschaft zu den biologisch wichtigen Elementen mitaufgenommen (62). Es war daher naheliegend, daß man den saprophytischen Kulturen Spurenelementkombinationen zusetzte. H.D. Michener und N. Snell (17) verwandten Lösungen von Zink,- Kupfer,- Mangan- und Eisensalzen; V. Tyler und A.E. Schwarting (23) benutzten die Grundnährlösung nach G. Beadle und E. Tatum (63); und L. Niedermaier (22) die A - Z-Lösung nach D.R. Hoagland (64). A. Stoll und Mitarbeiter legten besonderen Wert auf die Eisen und Zinkkonzentration.¹⁾

Wie die nachfolgende Übersicht zeigt, sind Spurenelemente für die Entwicklung der Wirtspflanze von Bedeutung. Es kann vermutet werden, daß sie auch für den Parasiten mehr oder weniger erforderlich sind.

Eisen ist für Mikroorganismen wie für höhere Pflanzen als Oxydationskatalysator im Warburgschen Atmungssystem not-

1) Die von der Sandoz A.G. Basel in Indien (No. 51 637, vom 24.3.1955) und in Frankreich (No. 1. 108. 120 v. 9.1. 1956) angemeldeten Patente kamen erst nach Abschluß der experimentellen Arbeiten zu meiner Kenntnis.

wendig. Die Farbstoffbildung der Mikroorganismen ist nach Ph.Lasseur (65) an die Anwesenheit von Eisen gebunden.

E.G.Mulder fand (66), daß bei Kupfermangel bei den Gramineen keine Ährenbildung einsetzt. Die Entwicklung der Sporen von *Aspergillus niger* ist von der Kupferkonzentration abhängig. Ohne Kupfer tritt keine Sporenbildung ein, bei zu niedriger Konzentration zeigen die Sporen nur Gelbfärbung, erst bei optimaler Gabe die normale schwarze Färbung. Der gleiche Autor stellte ebenfalls einen Einfluß auf die Säurebildung von *Aspergillus niger* fest.

Manganmangel führt nach H.Burström (67) bei Gramineen zu Chlorophylldefekten. Bei höheren Pflanzen katalysiert Mangan die Nitratreduktion. Nach J.Charney (68) soll es bei Mikroorganismen die Konidienbildung fördern, insbesondere bei *Aspergillus niger*. (H.Eberhard, 69).

Zink ist nach J.Schwaibold und G.Nagel (70) in Roggenkleie und Roggenkeimlingen angereichert. Es katalysiert den Eiweißstoffwechsel (A.Nason, 71), durch Förderung der Cocarboxylase den Kohlehydratstoffwechsel (K.Lohmann, 72), und bei *Aspergillus niger* den Stärkeabbau (J.Fischer, 73). Nach H.Bortels (74) ist es von Bedeutung für die Farbstoffbildung von *Bacterium prodigiosum*.

Bor hat nach W.Schropp und B.Arenz (75) eine wesentliche Bedeutung für das generative Wachstum der Gramineen. Ohne Bor erfolgt keine Kornausbildung, bei ungünstiger Jahreszeit sogar kein Ährenschieben. Nach E.Brandenburg (76) steht es in unmittelbarer Beziehung zu den Hauptnährstoffen; wenn Bor im Minimum ist, ist ihre Zufuhr gegenstandslos. Es hat keine Wirkung auf die Kohlensäureassimilation und den Eiweißstoffwechsel, wirkt aber zu starker Quellung der Plasmakolloide durch Dehydratation entgegen, und reguliert so die Kolloidaktivität.

Molybdän ist nach H.Bortels (77) für die Nitratreduktion von Bedeutung, nach D.J.D.Nicholas (78) ist die Nitratreduktase ein Mo-Flavoprotein.

Die aufgeführten Wirkungen der Spurenelemente lassen erkennen, daß den Stoffen nicht die Wirkungsweise eines Reizstoffes (32) oder einer Stimulation in ernährungsphysiologischer Sicht zukommt, sondern die Bedeutung einer reinen

Nährstoffwirkung (Rippel-Baldes, 61).

Zu orientierenden Vorversuchen verwandte ich die Grundnähr-
lösung nach G.Beadle und E.Tatum (63). Sie enthält neben Kalium-
dihydrogenphosphat, Magnesiumsulfat und Ammoniumnitrat die Spuren-
elemente Eisen, Calcium, Kupfer, Zink, Mangan, Molybdän und Bor
in Form ihrer Salze, ergänzend wurde noch Kobaltnitrat hinzuge-
fügt. Die Spurenelementlösung wurde an Stelle der sonst ent-
haltenen Mineralbestandteile Dextrosenährböden zugesetzt, deren
Stickstoffquelle Aminosäuren oder Säureamide waren. Die wichtig-
sten Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Nährboden	Spuren- element- zusatz	mg Alkaloid pro Kolben			
		Col 9	Stamm Fe/Te	El	66/3
Ammonsuccinat-Mannit	-	o	o,02	o	o
" "	+	o	o,31	o	o
Glycocoll-Dextrose	-	o	o	o	o
" "	+	o,72	1,05	o,87	o,73
Glutamat-Dextrose	-	o	o	o	o
" "	+	o,25	o,85	o	o
Glutamat-Asparagin-D.	-	o	o	o	o,65
" " "	+	o	o,62	o,25	o
Glycocoll-Asparagin-D.	-	o	o	o	o
" " "	+	o	o,53	o	o,91
Harnstoff-Dextrose	-	o	o	o	o
" "	+	o,16	o	o	o
Glycocoll-Glutamat-D.	-	o	o	o	o
" " "	+	o	o	o	o,87

Tabelle 8. Alkaloidgehalt der saprophytischen Kulturen mit
und ohne Spurenelementzusatz.

Bei einigen Nährstoffkombinationen konnte in den spurenelementhaltigen Kulturen Alkaloid nachgewiesen werden, während in den Kontrollen ohne den Zusatz die Alkaloidmenge unter der Erfassungsgrenze lag. Bei Spurenelementzusatz zu Kulturen des Stammes WD 198 auf Nährlösungen, die Serin, Leucin, Ammoniumpyruvat oder anorganische Stickstoffverbindungen enthielten, wurde keine Alkaloidbildung beobachtet. Auch bei Zusatz von Spurenelementen zu Peptonnährböden (Pepton der Charge 38 073) ergab sich keine Alkaloidbildung, ebenso zu Asparagin-Nährböden. Die zu der Untersuchung verwandten Stämme (Tabelle 8) bildeten auf Asparagin-Nährböden ohne Spurenelementzusatz Alkaloid. In diesem Zusammenhang stehende Untersuchungen in unserem Arbeitskreis (unveröffentlicht) zeigten, daß bei Verwendung der von A. Stoll bevorzugten Spurenelementlösung zu dem von ihm verwandten asparaginhaltigen Nährboden in den saprophytischen Kulturen nur Spuren von Alkaloid gebildet worden waren. Bei den von A. Stoll (Seite 18) als optimal empfohlenen Spurenelementkonzentrationen in Glycocoll-Nährlösungen ergaben sich keine höheren Alkaloidausbeuten als bei der üblicherweise angewandten Spurenelementkonzentration.

Die Versuche zeigen deutlich, daß zwar eine bestimmte Spurenelementversorgung vorhanden sein muß, daß aber von übergeordneter Bedeutung die gebotene Stickstoffquelle ist. Lag eine weniger geeignete Stickstoffquelle vor, hier Harnstoff, Glutamat, Ammoniumsuccinat, Pepton oder Asparagin, so trat nur in vereinzelt Fällen Alkaloidbildung ein. Gute Voraussetzungen schienen z.B. im Glycocoll-Nährboden gegeben zu sein. Die bei den aufgeführten Stämmen (Tabelle 8) stets eintretende Alkaloidbildung ermutigte dazu, das gesamte vorliegende Material an Clavicepsstämmen damit noch einmal durchzuprüfen. Die Ergebnisse sind in Abschnitt VI beschrieben.

IV. Das Verhalten der alkaloidbildenden Stämme bei wiederholter saprophytischer Kultur.

Wenn die als notwendig erkannten Voraussetzungen der Versorgung mit einer bestimmten Stickstoffquelle erfüllt war, konnten bei einer Reihe geeigneter Stämme grundsätzlich Alkaloidbildung erzielt werden. Die Höhe der Alkaloidbildung schwankte allerdings schon stark innerhalb einer kleinen Versuchsreihe (6 Kolben). Bei Wiederholungen unter den gleichen Bedingungen wich der Durchschnittswert oft von dem der Vorversuche ab. Letzteres konnte darauf zurückzuführen sein, daß die Alkaloidproduktion wesentlich durch weitere Faktoren beeinflusst wird, die sich bislang der Kontrolle entzogen. Auch H.Raßbach (32) beobachtete bereits bei Wiederholungen von Versuchsreihen im Kleinen, besonders aber im Großen, die er zur Gewinnung von Reinalkaloiden anlegte, große Unterschiede in der Alkaloidausbeute. Teilweise fielen präparativ verwertbare Mengen an, und teilweise lohnte sich die Aufarbeitung selbst größerer Mycelmengen nicht. Mit steigender Anzahl der Schrägagarpassagen des Impfmateri als für die Flüssigkulturen schien deren Alkaloidproduktion nachzulassen. Das führt H.Raßbach zu der Aussage: "... konnte man den Eindruck gewinnen, als ob die Vitalität und gleichzeitig die Potenz von K 90, in saprophytischer Kultur Alkaloide zu erzeugen, geringer geworden sei." Ähnliche Beobachtungen konnte auch ich bei einigen Stämmen machen. Der vorzugsweise zu Einzeluntersuchungen verwandte Stamm WD 198 wies z.B. im ersten Versuch auf Glycocoll-Nährlösung einen durchschnittlichen Alkaloidgehalt von 9,7 mg pro Kolben auf, bzw. einen Maximalgehalt im Trockenmycel von 0,457 %. Die zur Beimpfung der ersten Flüssigkultur verwandte Schrägagarkultur enthielt noch die zur Anlage der saprophytischen Kultur verwandten Sklerotien-gewebestückchen. Nach weiterem Überimpfen der Agarkulturen ergaben daraus angelegte größere und kleinere Kulturreihen wesentlich geringere und schwankende Ausbeuten.

Tabelle 9

Alkaloidgehalt des Ausgangssklerotiums WD 198: 0,89 %						
Alter der Schrägagar- kulturreihe in Monaten:	1	4	5	7	9	14
Anzahl der Überimpfungen	0	2	4	6	8	13
Alkaloidgehalt der Glyco- coll-Kulturen in mg pro Kolben	9,72	1,14	1,	1,74	2,65	1,05

Alkaloidgehalt und Anzahl der Schrägagarpassagen.

Zur Überprüfung der Erscheinung wurden alle vorhandenen, in saprophytischer Kultur alkaloidbildenden Stämme, die seit ihrer ersten Anlage bereits mehrere Schrägagarpassagen durchlaufen hatten, auf den gleichen Nährlösungen (Glycocoll) angelegt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Bei dem größeren Teil der Stämme scheint sich, wie Tabelle 10 zeigt, die Annahme eines Abfallens der Alkaloidproduktion zu bestätigen. 50 % der Stämme wies nach den angegebenen Zeitpunkten keinen, und etwa 10 % nur einen geminderten Alkaloidgehalt auf. Dagegen blieb der Alkaloidgehalt bei etwa 20 % erhalten und war bei 20 % sogar, teilweise stark, erhöht. Die Versuche zeigen, daß das gleichartige Verhalten der zu den Untersuchungen bevorzugt verwendeten Stämme K 90 und WD 198 statistisch als Zufall gewertet werden muß und sich nicht verallgemeinern läßt.

IV. a. Versuche zur Stimulation der Alkaloidproduktion durch Aminosäuren.

Gleichlaufend mit diesen Untersuchungen wurde nach Vorkehrungen gesucht, die dem Alkaloidabfall entgegenwirken sollten. Das erschien besonders für den Stamm WD 198 wichtig, da er ein

Tabelle 10

Stamm	Alter d. Reihe	Anzahl d. Überimpf.	Gehalt mg/Kolben	Alter d. Reihe	Anzahl d. Überimpf.	Gehalt mg/Kolben
Fe/Te	20 ^m	14	1,05	26 ^m	20	0,75
Fe/Te 1954	3 ^w	0	1,75	12 ^m	10	10,6
Col 9	9 ^m	7	0,72	25 ^m	23	0,21
Col 9 1954	6 ^w	0	0,17	11 ^m	9	0,40
El	19 ^m	14	0,87	25 ^m	20	0,0
66/3	18 ^m	16	0,73	36 ^m	34	0,0
1081	9 ^w	0	0,21	11 ^m	9	0,0
1128	4 ^w	0	0,22	10 ^m	9	0,65
1160	5 ^w	0	0,23	10 ^m	8	0,0
6014	7 ^w	0	1,34	10 ^m	8	0,0
6060	7 ^w	0	0,30	10 ^m	8	1,31
M 5001	5 ^w	0	1,14	10 ^m	8	0,0
WD 006	8 ^w	0	0,72	15 ^m	13	0,0
WD 018	7 ^w	0	0,21	15 ^m	13	0,0
WD 020	7 ^w	0	0,40	15 ^m	13	0,30
WD 091	4 ^w	0	0,99	14 ^m	13	0,53
WD 246	4 ^w	0	0,83	14 ^m	12	0,0
WD 310	8 ^w	0	0,17	10 ^m	8	1,89
WD 452	8 ^w	0	1,77	10 ^m	8	0,0
WD 457	8 ^w	0	0,41	10 ^m	8	0,0
WD 467	8 ^w	0	0,16	10 ^m	8	0,0
WD 576	6 ^w	0	0,40	12 ^m	10	0,0
WD 620	8 ^w	0	0,29	10 ^m	8	0,0
WD 688	5 ^w	0	0,76	12 ^m	10	0,77
WD 736	5 ^w	0	0,58	12 ^m	10	0,59
WD 771	7 ^w	0	1,18	10 ^m	8	0,0
WD 1350	4 ^w	0	1,17	11 ^m	10	3,56
WD 1487	3 ^w	0	1,19	11 ^m	10	2,30
WD 1517	4 ^w	0	0,77	12 ^m	11	0,74
WD 1608	8 ^w	0	1,70	12 ^m	10	2,14

Alkaloidgehalt in Abhängigkeit von der Anzahl der Überimpfungen, Durchschnittswerte von 6 Kolben.

w = Wochen

m = Monate

hohes Alkaloidbildungsvermögen aufgewiesen hatte. Schon H. Raßbach (32) versuchte die Alkaloidproduktion durch Aminosäuren zu stimulieren. Obwohl Tryptophan- oder Asparaginzusatz zu Peptonkulturen von Stamm DK 011 keinen Erfolg hatte, zeigte der davon abstammende Klon K 90 bei solchen Zusätzen eine Verdoppelung des Alkaloidgehaltes bei Versuchsreihen zu je drei Kolben. Trotz des Alkaloidgehaltes von 0,1 % des Mycelgewichtes in diesen Kontrollreihen wies eine gleichzeitig laufende größere Versuchsreihe des gleichen Stammes auf gleichen Nährböden kein Alkaloid auf.

Zur Steigerung der Alkaloidproduktion untersuchte ich ebenfalls an Stamm WD 198 die Eignung von Substanzen, die möglicherweise "Vorstufen" der Lysergsäurebiosynthese sein könnten. Ein Zusatz von Tryptophan zu Glycocoll-Nährlösungen in 0,001 - 0,005-molarer Konzentration ergab keine Steigerung des Alkaloidgehaltes, die Werte streuten von 0,5 bis 4 mg pro Kolben. Die Versuche gibt Tabelle 11 wieder.

Stamm	Nährboden	Tryptophan- konzentration	Alkaloidgehalt		Mycel- gewicht
			Durch- schnitt	maxi- mal	
WD 198	Glycocoll	0	1,74 mg	2,2 mg	2,15 g
WD 198	"	$1,0 \cdot 10^{-3}$ molar	1,55 mg	1,9 mg	2,15 g
WD 198	"	$2,5 \cdot 10^{-3}$ molar	1,61 mg	2,2 mg	2,3 g
WD 198	"	$5,0 \cdot 10^{-3}$ molar	2,04 mg	4,1 mg	2,45 g

Tabelle 11. Tryptophanzusatz zu Glycocoll-Kulturen.

Ebenso wurde der Einfluß von Tyrosin untersucht, das ebenfalls im Mutterkorn festgestellt wurde (80). Da Tyrosin durch die bei Pilzen weitverbreitete Tyrosinase über Dioxyphenylalanin zu den Melaninen oxydiert wird, wobei es intermediär zur Ausbildung von Indolderivaten kommt, diskutiert E.E. van Tamelen (81) sie als Baustein für die Lysergsäure in vivo. Wie Tabelle 12 zeigt, war kein Einfluß auf die Alkaloidbildung festzustellen.

Stamm	Nährboden	Tyrosin- konzentration	Alkaloidgehalt pro Kolben		Mycel- gewicht
			Durch- schnitt	maxi- mal	
WD 198	Glycocoll	o	1,74 mg	2,2 mg	2,15 g
WD 198	"	$1,1 \cdot 10^{-3}$ molar	1,26 mg	2,3 mg	2,5 g
WD 198	"	$2,2 \cdot 10^{-3}$ molar	1,74 mg	2,3 mg	2,3 g

Tabelle 12. Tyrosinzusatz zu Glycocoll-Kulturen.

Mischungen von Tryptophan und Tyrosin in den oben angeführten Konzentrationen hatten keinen Einfluß auf die Höhe der Alkaloidbildung. Ebenso wenig hatte Zusatz von $0,8 \cdot 10^{-3}$ mol/l Prolin und $0,5 \cdot 10^{-3}$ mol/l Oxyprolin zu Glycocoll-Nährlösung Erfolg. Die Literaturangaben über Tryptophanzusätze sind uneinheitlich. Während S.K.Sim und H.W. Youngken (25) eine Steigerung des relativen Alkaloidgehaltes und Abnahme des Mycelgewichtes feststellten, konnten A.G.Paul, W.J.Kelleher und A.E.Schwarting (24) bei $0,44 \cdot 10^{-3}$ molarer Lösung keinen Einfluß feststellen. Sie fanden aber, daß *Claviceps purpurea* aus Indol und Serin Tryptophan zu bilden vermag, und daß es auch vom Pilzgewebe aufgenommen wird (23,26). G.Gjerstad und E.Ramstad (30) konnten bei Zusatz in $0,02$ - $0,04$ -molarer Konzentration keinen Erfolg erzielen.

IV. b. Kälteeinwirkung als Reiz.

Als weiteren Faktor hat H.Raßbach die Kälteeinwirkung als einen Reiz untersucht, dem auch in der Natur das Pilzgewebe unterliegt. Er ging dabei von den Beobachtungen unseres Arbeitskreises aus, daß die Keimungsrate der Konidien anstieg, wenn die Ausgangskulturen einer Kälteeinwirkung unterworfen worden waren. Weiterhin von den Beobachtungen von H.Kirchhoff (8), G.Krebs (12) und G.Schweizer (13), daß tiefe Temperaturen auf das Sklerotium als Fruktifikationsreiz wirken. H.Raßbach (32) unterwarf die zum Beimpfen der Flüssigkulturen bestimmten Agarkulturen einer 14-tägigen Kälteeinwirkung bei -30°C . Die damit

angelegte Versuchsreihe mit Pepton-Nährlösung zeigte gegenüber der unbehandelten Kontrolle ein schnelleres Wachstum und ergab eine Verdoppelung des Alkaloidgehaltes.

Den Einfluß von Temperaturreizen untersuchte ich an mehreren Stämmen (Tabelle 13). Um eine gewisse Anpassung an die natürlichen Bedingungen zu erhalten, wurden die Schrägagarkulturen der Stämme im Frühjahr 1955 vom 16. März bis zum 1. Mai im Freien aufbewahrt. Die Temperatur schwankte in diesem Zeitraum etwa von -5°C bis $+10^{\circ}\text{C}$. Mit den so behandelten Schrägagarkulturen wurden Glycocoll-Nährböden beimpft. Sie zeigten folgende Alkaloidgehalte:

Tabelle 13

Stamm	Nährboden	Durchschn. Alkaloidgehalt eines Kolbens von sechs.	
		ohne	mit Kälteeinwirkung
El	Glycocoll	0,87 mg	0,25 mg
Col 9	"	0,73 mg	0,0
Fe/Te	"	1,05 mg	0,71 mg
Fe/Te 1954	"	1,75 mg	6,8 mg
66/3	"	0,73 mg	0,0
WD 006	"	0,74 mg	0,0
WD 018	"	0,21 mg	0,0
WD 198	"	1,74 mg	10,7 mg
WD 246	"	0,83 mg	0,72 mg

Wie die Tabelle 13 zeigt, trat bei den Stämmen Fe/Te 1954 und WD 198 eine Steigerung des Alkaloidgehaltes auf. Er entsprach mit 10 mg pro Kolben dem Alkaloidgehalt, der bei der ersten Untersuchung an WD 198 ermittelt wurde. Bei den übrigen Stämmen war der Alkaloidgehalt gleich, oder stark gemindert. Der Versuch zeigt ebenfalls das stark unterschiedliche Verhalten der einzelnen Stämme.

Durch die Steigerung des Alkaloidgehaltes der Stämme WD 198 und Fe/Te 1954 wurde die Frage aufgeworfen, ob hierfür die

tiefe Temperatur an sich oder die witterungsbedingten Temperaturschwankungen im genannten Bereich verantwortlich sind. Zur Überprüfung wurden Kulturen des Stammes WD 198 zwei Monate im Kühlschrank bei 0° aufbewahrt. Die erwartete Steigerung des Alkaloidgehaltes trat nicht ein. Er betrug 1,8 mg pro Kolben gegenüber 1,05 mg der Kontrolle.

Nun wurden Schrägagarkulturen beider Stämme einer Kälteeinwirkung bei -30°C unterworfen. Bei Stamm Fe/Te 1954 wurde nach einmonatiger Einwirkung in der damit angelegten Flüssigkultur ein doppelter Alkaloidgehalt gefunden. Bei Stamm WD 198 trat bei 14-tägiger und 30-tägiger Einwirkung ein verschlechtertes Mycelwachstum und geringere Alkaloidausbeute ein. Die Befunde waren unabhängig davon, ob die Stämme auf Pepton- oder auf Glycocoll-Schrägagarböden der Kälte ausgesetzt waren. Die Ergebnisse gibt Tabelle 14 wieder.

Stamm	Nährboden d. Schrägagarkultur	Kältebehandlung		Alkaloidgehalt pro Kolben auf Glycocoll-Nlsg.
		Dauer	Temperatur	
WD 198	Pepton	o	+20°	1,74 mg
WD 198	Pepton	14 ^d	-30°	0,57 mg
WD 198	Glycocoll	14 ^d	-30°	0,46 mg
WD 198	Pepton	o	+20°	1,05 mg
WD 198	Pepton	30 ^d	-30°	0,23 mg
Fe/Te 1954	Pepton	o	+20°	1,75 mg
Fe/Te 1954	Pepton	30 ^d	-30°	3,49 mg
Fe/Te 1954	Glycocoll	30 ^d	-30°	3,95 mg

Tabelle 14. Durchschnittlicher Alkaloidgehalt eines Kolbens (aus Reihen von 6 - 12 Kolben) nach Kälteeinwirkung.

Die Ergebnisse der Kältebehandlung der Stämme WD 198, Fe/Te 1954, K 90 und der anderen aufgeführten Stämme lassen keine gesicherte Aussage über deren Wirkung zu. Aus den differierenden Ergebnissen herausragende Einzelerfolge lassen aber weitere Versuche in dieser Richtung aussichtsreich er-

scheinen. Die im physiologischen Bereich liegenden Temperaturschwankungen scheinen die Alkaloidbildung günstig zu beeinflussen.

IV. c. Parasitische Zwischenpassagen als Reiz.

Es lag nahe zu vermuten, daß die saprophytische Kultur für den Pilzorganismus eine anormale Lebensweise darstellt und dadurch Störungen des "normalen" Stoffwechselablaufes eintreten könnten. Es war zu befürchten, daß die fortlaufende vegetative Vermehrung in saprophytischer Kultur immer stärker in Erscheinung tretende Schädigungen hervorrufen könnte. Die oben beschriebenen Ergebnisse (Tabelle 11) veranlassten mich, die anzunehmenden Stoffwechselstörungen dadurch wieder in normale Bahnen zu leiten, daß ich die auf Schrägagarkulturen vegetierenden Stämme einer parasitischen Zwischenpassage unterwarf. Dazu diente der oben erwähnte Versuchsfeldanbau in den Vegetationsperioden 1954 und 1955. Einzelne aus diesem Anbau gewonnene Sklerotien wurden wieder zur Anlage saprophytischer Kulturen verwandt. Ihr Alkaloidbildungsvermögen wurde auf Glycocoll-Nährböden überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

Während die Alkaloidgehalte in parasitischer Kultur annähernd mit den Ergebnissen der Vorjahre übereinstimmten, zeigten die Alkaloidgehalte der daraus angelegten saprophytischen Kulturen in den wenigsten Fällen Übereinstimmung. Etwa 30 % der Kulturen wiesen den gleichen Gehalt wie die Ausgangsstämme auf, bei der gleichen Anzahl trat eine zum Teil beachtliche Steigerung des Alkaloidgehaltes auf (WD 006, WD 018). In 40 % der untersuchten Fälle wiesen die Kulturen einen geringeren Alkaloidgehalt als die Ausgangsstämme auf. Das gilt auch für den Stamm WD 198.

Zusammenfassend ergibt sich aus den bisherigen Versuchen mit den 30 genannten Stämmen, daß es nicht möglich ist, die Streuungen des Alkaloidgehaltes der saprophytischen Kulturen auszuschalten.

Zur Überprüfung der Annahme, daß fortlaufende Schrägagarpassagen des Pilzes zu einer Veränderung der ursprünglichen Eigenschaften führen könnten, wurde in unserem Arbeitskreis (unveröffentlicht) ein über ein halbes Jahr laufender Großversuch durchgeführt. Zu Beginn wurde eine große Menge Schrägagarkulturen des Stammes K 90 angelegt, und nach dreiwöchentlicher Mycelentwicklung bei Zimmertemperatur wurden sie bei -25° im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Alle 7 Tage wurden davon fünf Schrägagarkulturen zum Beimpfen von 50 Kolben mit Glycoll-Nährlösung verwandt. Auch hier traten die sonst beobachteten Schwankungen im Alkaloidgehalt auf, sie sind demnach wohl nicht auf die fortlaufenden Schrägagarpassagen zurückzuführen. Der Einwand, daß auch bei diesem Versuch eine Schädigung durch das lange Verbleiben des Pilzes auf der Schrägagarkultur im Kühlschrank eintreten könnte, wird durch die Tatsache widerlegt, daß kein fortlaufender Abfall der Alkaloidproduktion erfolgte, sie zeigte nur starke Schwankungen.

Tabelle 15

Stamm	Ernte	Gehalt paras. %	Gehalt sapr. mg/Kolben	Versuchsfeld		Bezeich- nung	Gehalt paras. %	Gehalt sapr. mg/Kolben
				Jahr	Wirt			
Fe/Te	1952	0,1	1,05	1954	Gerste	Fe/Te 1954	pos.	1,75
Col 9	1953	pos.	0,72	1954	Roggen	Col 9 1954	1,26	0,17
El	1952	0,47	0,87	1954	"	El 1954	1,05	0,0
66/3	1953	0,85	0,73	1954	"	66/3 1954	1,10	0,0
WD 006	1952	0,63	0,72	1955	"	WD 006 /2	0,82	5,69
						WD 006 /4	0,83	2,68
						WD 006 /13	0,99	9,18
WD 018	1952	0,75	0,21	1955	"	WD 018 /2	0,94	1,80
						WD 018 /3	0,98	5,24
						WD 018 /8	1,18	0,0
WD 020	1952	0,81	0,40	1955	"	WD 020 /1	0,94	7,42
						WD 020 /13	0,90	0,0
WD 091	1952	0,87	0,99	1955	"	WD 091 /7	0,53	0,52
						WD 091 /8	0,67	1,57
WD 198	1952	0,89	9,72	1955	"	WD 198 /1	0,86	0,61
						WD 198 /3	0,55	0,81
						WD 198 /5	0,51	0,91
						WD 198 /12	0,80	0,57
						WD 198 /16	0,47	0,86
						WD 198 /18	0,77	0,70
						WD 198 /19	0,77	1,40

Stamm	Ernte	Gehalt paras. %	Gehalt sapr. mg/Kolben	Versuchsfeld Jahr	Wirt	Bezeich- nung	Gehalt paras. %	Gehalt sapr. mg/Kolben
WD 246	1952	1,19	0,83	1955	Roggen	WD 246 /14	0,99	0,0
						WD 246 /19	0,91	0,17
WD 688	1952	1,08	0,76	1955	"	WD 688 /8	1,07	0,71
						WD 688 /16	1,07	0,31
						WD 688 /18	0,88	0,64
WD 736	1952	0,99	0,58	1955	"	WD 736 /18	0,91	0,28
						WD 736 /19	0,98	0,0
						WD 736 /20	0,96	0,0
WD 1350	1954	0,83	1,17	1955	"	WD 1350 /1	0,86	2,1
						WD 1350 /13	1,13	0,68
WD 1487	1954	0,87	1,19	1955	"	WD 1487 /11	0,89	2,31
						WD 1487 /12	0,91	2,51
						WD 1487 /17	0,91	2,58
WD 1517	1954	0,76	0,77	1955	"	WD 1517 /2	0,96	1,63
						WD 1517 /6	0,90	1,71
						WD 1517 /15	0,88	0,58
WD 1608	1954	0,79	1,70	1955	"	WD 1608 /5	1,18	0,26
						WD 1608 /11	1,07	1,01
6014	1953	1,13	1,34	1955	"	6014/6	1,10	0,61
						6014/9	1,27	4,34

Tabelle 15. Durchschnittlicher Alkaloidgehalt einer Glycocoll-Kolbenkultur vor und nach einer parasitischen Zwischenpassage, errechnet aus Versuchsreihen zu je 6 Kolben.

V. Diskussion der angewandten Methodik.

Zur Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse erscheint mir an dieser Stelle eine kritische Beleuchtung der Methodik notwendig.

Stehen größere Mengen an Untersuchungsmaterial zur Verfügung, so ist, wie eingangs erwähnt, die gravimetrische Erfassung als Reinalkaloid vorzuziehen. Bei den durchgeführten Reihenversuchen war aber mit Alkaloidgehalten von höchstens 10 mg pro Kolben, durchschnittlich jedoch nur etwa 1 mg, zu rechnen. Daher wurde der Alkaloidgehalt auf dem Wege der photometrischen Bestimmung der mit dem Reagens nach H.W.van Urk entstandenen Blaufarbe ermittelt. Die angegebenen Alkaloidmengen stellen ein Äquivalent zu der Menge an Ergotamin dar, die bei gleichem Volumen an Lösungsmittel die gleiche Lichtdurchlässigkeit ergibt. Eine Ausnahme bildet die Angabe bei Ergometrin, dort sind die Angaben auf das entsprechende Molekulargewicht bezogen. Da aber eine Reihe anderer Substanzen, hauptsächlich Indolderivate (32,82) ebenfalls Blaufärbungen mit dem Reagens ergeben, teilweise in der gleichen Größenordnung, wie z.B. Indolyl-3-essigsäure, schränkte H.Raßbach (32) die Anzahl dieser Stoffe dadurch ein, daß die Extrakte aus den Mycelien und die Kulturfiltrate im alkalischen Bereich mit Methylenchlorid ausgeschüttelt wurden. Somit konnten nur basisch oder neutral reagierende Substanzen die quantitative Bestimmung beeinflussen.

A.Stoll und Mitarbeiter (52) konnten im Kulturfiltrat die Alkaloide bei Konzentrationen von 1 - 6 mg % für vergleichende Untersuchungen hinreichend genau durch Versetzen mit van Urk's Reagens bestimmen. Für meine Reihenversuche erwies sich das Verfahren infolge der geringeren Alkaloidgehalte als weniger geeignet. Die Kulturfiltrate der Nährböden nach M.Abe (36) und H.Kirchhoff (8) ergaben nach der Methode von A.Stoll (52) zum Teil Blauwerte bis zu 1,6 mg %, während die unbeimpften Nährlösungen mit dem gleichen Reagens keine Blaufärbung zeigten. Schüttelte man die 25-fache Menge des alkalisierten Kulturfiltrates mit Methylenchlorid aus, so ergab der Rückstand keine positive Reaktion. Ob die Blaufärbung bei der direkten Bestimmung durch Substanzen mit Alkaloid-

charakter verursacht wurde, die bei der Ausschüttelung mit Methylenchlorid nicht erfasst wurden, oder durch die erwähnten Indolderivate, bedarf weiterer Untersuchungen.

Stamm	Methode	Farbe bei Versetzen mit van Urk-Reagens:				
		Stickstoffquelle des Nährbodens:				
		Anorg.	Pepton	Asparag.	Ammon-succin.	Glyco-coll
WD 012	direkt ausge- schüttelt	blau	blau	blau	blau	blau
		o	o	o	o	o
WD 016	direkt ausge- schüttelt	o	blau	blau	blau	blau
		o	rot	rot	o	o
WD 122	direkt ausge- schüttelt	blau	blau	blau	violett	blau
		o	o	o	o	rot
WD 159	direkt ausge- schüttelt	blau	violett	blau	blau	blau
		o	o	o	o	o
WD 220	direkt ausge- schüttelt	blau	blau	blau	blau	blau
		o	o	o	o	o
WD 091	direkt ausge- schüttelt	blau	rot	blau	blau	blau
		o	o	o	o	blau
WD 246	direkt ausge- schüttelt	violett	violett	blau	blau	violett
		o	o	o	o	blau

Tabelle 16. Farbreaktionen der Kulturfiltrate mit Reagens nach van Urk. Direktes Versetzen und Versetzen der Rückstände der Methylenchloridausschüttelung.

Unter den gegebenen Möglichkeiten erscheint mir die angewandte Bestimmungsmethode zur Bewertung der Alkaloidproduktion trotz ihrer Fehlerbreite geeignet. Die beobachteten Schwankungen im Alkaloidgehalt der Kulturen gingen über die

von A.Stoll (52) für seine Methode angegebene Fehlerbreite ($\pm 10\%$) und die übliche biologische Streuung weit hinaus. Bedeutsam erscheint mir in diesem Zusammenhang der biologische Zustand des Organismus bei der Abernte zu sein. Die Analyse zu diesem Zeitpunkt ist aber nur ein Herausgreifen eines bestimmten Entwicklungsstadiums des Organismus. Die Abernte und die Bestimmung des Alkaloidgehaltes erfolgte nach 40 bis 50 Tagen Kulturdauer. Zu dem Zeitpunkt waren die Nährstoffe weitgehend verbraucht. Das machte sich in einem Absinken der Dichte von 1,03 - 1,04 auf 1,00 - 1,01, und in einer Verschiebung des P_H -Wertes der Nährlösung von 5,4 zum Alkalischen hin bemerkbar. Nach M.Abe (40) und H.Raßbach (32) ist bei Erreichen des Zustandes ein Maximum an Myceltrockengewicht zu erwarten. Ebenso soll dort nach M.Abe (40) ein Maximum an Alkaloid auftreten. Innerhalb der Kulturreihen zeigten die Mycelien der einzelnen Kolben aber eine unterschiedlich schnelle Entwicklung. Oft war ein Teil weniger stark gefärbt, die Mycelstruktur weniger stark ausgeprägt und hatte ein geringeres Mycelgewicht als der andere. Man darf danach annehmen, daß auch der biologische Zustand unterschiedlich war. Der ermittelte Alkaloidgehalt derartiger Kulturreihen stellt einen Mittelwert der Alkaloidgehalte des Pilzes in verschiedenen Entwicklungsstadien dar und mußte zwangsläufig zur Bewertung des Alkaloidbildungsvermögens eines Stammes herangezogen werden. Eine Anhäufung der Alkaloide bis zu dem oben gekennzeichneten Zeitpunkt ist zwar wahrscheinlich, aber es liegen keine experimentellen Unterlagen dafür vor. Dabei ist auch zu bedenken, daß die Alkaloide in wässrigem Milieu nur bedingt stabil sind. Es ist also damit zu rechnen, daß in den saprophytischen Kulturen neben dem Aufbau auch ein Abbau der Alkaloide stattfindet, über dessen Ausmaß noch wenig bekannt ist. Bei unbeimpfter Asparaginnährlösung stellten H.D.Michener und N.Snell (17) einen Verlust von 56 % des zugesetzten Alkaloids in einem Zeitraum von 22 Tagen fest, die Ergotamintartratkonzentration sank von 0,48 mg% auf 0,21 mg%.

Innerhalb der Kontrollmöglichkeiten wurden die Kulturbedingungen bei den Versuchsreihen gleich gehalten. Wie mehrfach erwähnt, trat dennoch bei kleinen und auch bei größeren Versuchsreihen in Wachstum und Alkaloidgehalt eine starke

Streuung auf. Auch bei den Versuchsreihen von H. Raßbach (32) auf Peptonnährböden war nur ein Teil der Kolbenkulturen zur Weiterverarbeitung geeignet. Erfahrungsgemäß war bei Mycelien mit zurückgebliebenem Wachstum und fehlender Violettfärbung ein sehr niedriger oder kein Alkaloidgehalt zu erwarten. Diese Mycelien wurden bei großen Versuchsreihen nicht weiterverwendet. Bei meinen Versuchen mit dem von H. Raßbach ebenfalls verwandten Stamm K 90 waren ebenso nur 176 von 240 Kolben zur Weiterverarbeitung brauchbar. Die davon zu Probeanalysen entnommenen Kulturen wiesen, wie Tabelle 17 zeigt, starke Unterschiede im Alkaloidgehalt auf.

Versuchsnummer	Stamm	Nährboden	Kulturdauer	Mycelgewicht	Alkaloidgehalt
1340/13	K 90	Glycocoll	36 ^d	2,7 g	2,6 mg
1340/14	K 90	"	36 ^d	1,5 g	2,0 mg
1340/15	K 90	"	36 ^d	2,7 g	6,2 mg
1340/16	K 90	"	36 ^d	2,6 g	4,0 mg
1340/17	K 90	"	36 ^d	2,8 g	1,9 mg
1340/18	K 90	"	36 ^d	2,7 g	3,7 mg
Durchschnittlicher Alkaloidgehalt					
in den Probekolben 1340/13 - 18 : 0,136 %				2,5 g	3,4 mg
des Gesamtversuches 1340 : 0,166 %				2,1 g	3,4 mg

Tabelle 17. Probeanalysen des Versuches 1340.

Aus der vorstehenden Tabelle 17 erkennt man, daß es nicht möglich ist, durch die Bestimmung von nur 6 Kolben einer größeren Versuchsreihe Schlüsse auf den Gesamtalkaloidgehalt und das Gesamtmycelgewicht zu ziehen. Die Übereinstimmung der Mittelwerte der Alkaloidgehalte pro Kolben kann infolge der starken Streuung der Einzelwerte nicht als signifikant angesehen werden. Dieses Beispiel des aus einer Konidie hervorgegangenen Stammes K 90 wurde aus dem übereinstimmenden

Gesamtbild der bisherigen Versuche herausgegriffen, um zu zeigen, daß selbst bei Klonstämmen eine solche Streuung auftritt, obwohl hier genetisch einheitliches Material angenommen wird. Solche Schwankungen hätten bei den Abimpfungen von Wildmutterkorn, das meist aus Populationen besteht, auf Entmischungserscheinungen und unterschiedliches Verhalten der darin enthaltenen Biotypen zurückgeführt werden können.

Bei den beobachteten Streuungen der Alkaloidgehalte innerhalb der Versuchsreihen erscheint mir eine Aussage über die Beeinflussung der Alkaloidbildung durch Vorstufen wie Tryptophan, Passage über die Wirtspflanze und Kältereize nicht gesichert. Erst wenn Bedingungen aufgefunden worden sind, unter denen der Pilz fortlaufend eine annähernd gleiche Alkaloidproduktion zeigt, ist eine Bewertung der Höhe der Alkaloidproduktion nach Veränderung der Kulturbedingungen möglich.

VI. Entwicklung eines geeigneten, chemisch definierten Nährbodens.

Um den oben erwähnten Kulturbedingungen nahezukommen, ist zunächst ein chemisch definierter Nährboden notwendig. Pepton und andere derartige Organzubereitungen können Unterschiede in der Zusammensetzung aufweisen. Das zeigen die bereits erwähnten Versuche von H. Raßbach (32) über die unterschiedliche Eignung verschiedener Peptonchargen gleichen Herstellungsverfahrens für die saprophytische Kultur der Stämme DK 011 und K 90.

Bei den oben genannten Untersuchungen (Seite 17) über die Eignung von Aminosäuren fielen die Mycellien der Glycocoll-Kulturen durch ihr abweichendes Aussehen auf. Sie waren violett gefärbt und zeigten morphologische Besonderheiten. Hervorzuheben ist, daß alle zunächst verwandten vier Stämme (Tabelle 8) auf Glycocoll-Nährböden Alkaloid bildeten. Daher wurde die Eignung der Glycocoll-Nährlösung an den erwähnten 210 Stämmen erprobt. (Siehe Tabelle 18).

Tabelle 18

Stamm	Wirtspflanze	Fundort	Jahr	Gehalt paras.	Gehalt der Saprophyt. Kult. Durchschn. Maxi- mal in mg/Kolben	mal Myce
Fe/Te	<i>Festuca elatior</i>	Tegernsee	1952	0,10 %	1,05	0,05
El	<i>Elymus europaeus</i>	Wertach	1952	0,47 %	0,87	0,04
Col 9	<i>Hordeum sativum</i>	Columbien	1953	pos.	0,72	0,02
Po 19/1	<i>Secale cereale</i>	Portugal	1952	0,94 %	1,41	0,10
66/3	" "	Mainz	1952	0,85 %	0,73	0,05
1081	" "	Mainz	1954	1,65 %	0,21	0,02
1128	" "	Mainz	1954	1,65 %	0,22	0,04
1160	" "	Mainz	1954	1,58 %	0,23	0,02
6014	" "	Ungarn	1953	1,13 %	1,34	0,05
6060	" "	Ungarn	1953	1,05 %	0,30	0,07
M 5001	" "	Handels- droge	1954	0,74 %	1,14	0,06
U 009	" "	Ungarn	1954	1,02 %	0,93	0,05
WD 006	" "	Füssen	1952	0,63 %	0,72	0,04
WD 018	" "	Füssen	1952	0,75 %	0,21	0,01
WD 020	" "	Füssen	1952	0,81 %	0,40	0,02
WD 091	" "	Kempton	1952	0,87 %	0,99	0,05
WD 198	" "	Lechbruck	1952	0,89 %	9,72	0,45
WD 246	" "	"	1952	1,19 %	0,83	0,05
WD 310	" "	"	1952	0,84 %	0,17	0,01
WD 452	" "	Füssen	1952	0,86 %	1,77	0,06
WD 457	" "	"	1952	0,88 %	0,41	0,02
WD 467	" "	"	1952	0,86 %	0,16	0,01
WD 576	" "	Kempton	1952	0,94 %	0,40	0,03
WD 620	" "	"	1952	0,80 %	0,29	0,01
WD 688	" "	"	1952	1,09 %	0,76	0,05
WD 736	" "	"	1952	0,98 %	0,58	0,03
WD 771	" "	Lechbruck	1952	0,84 %	1,18	0,05
WD 1350	" "	Roßhaupt.	1954	0,83 %	1,17	0,11
WD 1487	" "	"	1954	0,87 %	1,19	0,09
WD 1517	" "	"	1954	0,76 %	0,77	0,03
WD 1608	" "	"	1954	0,79 %	1,70	0,07
W1 002	" "	Wicker	1954	0,85 %	0,95	0,03
WT 004	" "	"	1954	0,61 %	0,16	0,01

Stamm	Wirtspflanze	Fundort	Jahr	Gehalt paras.	Gehalt der Saprophyt. Kulturen	
					Durchschn. in mg/Kolben	Maximal im Mycel
WT 005	Secale cereale	Wicker	1954	0,80 %	1,71	0,134 %
WTC 021	" "	"	1954	0,94 %	1,07	0,057 %
WTC 028	" "	"	1954	1,35 %	2,28	0,079 %
WTC 030	" "	"	1954	1,37 %	0,64	0,028 %
W1 031	" "	"	1954	0,95 %	1,39	0,072 %
W1 033	" "	"	1954	0,97 %	3,15	0,142 %
W1 039	" "	"	1954	0,84 %	0,31	0,024 %
W1 041	" "	"	1954	0,92 %	2,76	0,126 %
W1 042	" "	"	1954	0,94 %	1,57	0,066 %
W1 045	" "	"	1954	0,66 %	0,45	0,020 %
WTC 049	" "	"	1954	1,33 %	0,19	0,033 %
W1 057	" "	"	1954	0,85 %	3,09	0,200 %
W1 060	" "	"	1954	0,88 %	1,40	0,100 %
WT 067	" "	"	1954	0,58 %	1,65	0,050 %
WTC 081	" "	"	1954	1,33 %	0,12	0,012 %
WT 117	" "	"	1954	0,87 %	1,69	0,130 %
W1 121	" "	"	1954	0,72 %	0,45	0,019 %

Durchschnittliche Alkaloidgehalte pro Kolben auf Glycocoli-Nährböden, daneben der in Versuchsreihen zu 6 Kolben maximal erreichte Prozentgehalt im Trockenmycel.

Die vorstehende Tabelle 18 zeigt, daß ein großer Teil der Stämme auf diesem neuen, einfach zusammengesetzten Nährboden Alkaloid zu bilden vermag. Man darf annehmen, daß der Nährboden den zur Alkaloidbiosynthese notwendigen Anforderungen besser entspricht als die bisher verwandten. Hervorzuheben ist das Ergebnis, daß die Stämme WD 198, W1 033 und W1 057 auf Glycocoli-Nährlösung hohe Alkaloidgehalte aufwiesen, während sie auf den bisher verwandten Nährböden keine nachweisbaren Mengen an Alkaloid bildeten.

Wie erwähnt, hatten M.Abe und Mitarbeiter (34) 500, und H.Raßbach etwa 100 Stämme auf ihr Alkaloidbildungsvermögen in saprophytischer Kultur untersucht. Auf den von ihnen angewandten Nährböden waren

davon nur 4 % in der Lage, Alkaloid zu bilden. Bei Verwendung der gleichen Nährböden waren auch bei den von mir untersuchten 210 Stämmen nur wenige dazu in der Lage (Tabelle 7 u. 19). Auf der Glycocoll-Nährlösung waren dagegen von den 210 untersuchten Stämmen 50 zur Alkaloidbildung befähigt.

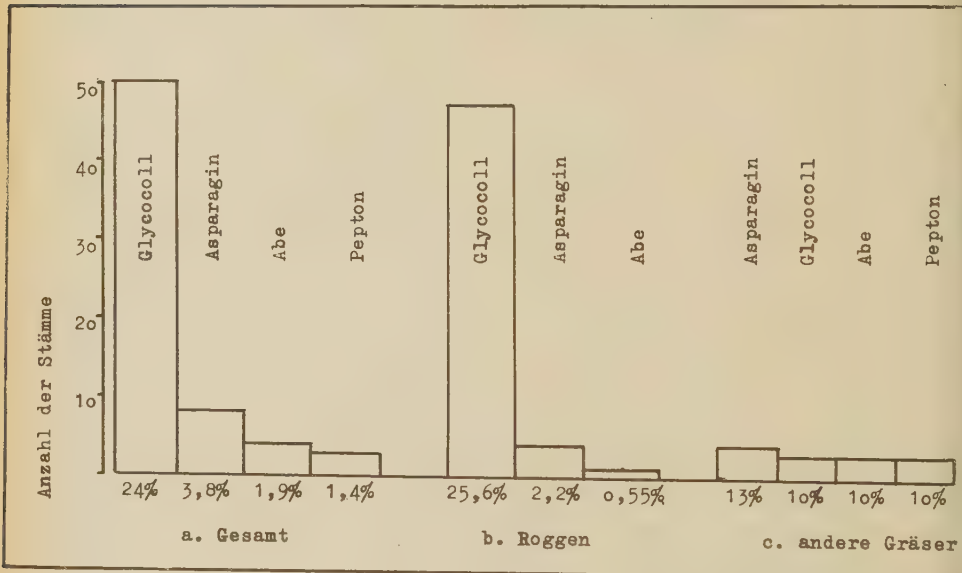


Tabelle 19.

Tabelle 19 zeigt die Abhängigkeit des Alkaloidbildungsvermögens der 210 untersuchten Stämme vom Nährboden. Die Erfolge von M. Abe (34-51) mit saprophytischen Kulturen von Mutterkornstämmen, die auf anderen Gräsern als Roggen aufgefunden worden waren, regten zu einer vergleichenden Betrachtung an (Tabelle 19, b u. c). 180 der von mir untersuchten Stämme gehen auf Sklerotien zurück, die auf Roggen aufgefunden

wurden, die restlichen 30 stammten von Mutterkörnern, die auf anderen Gräsern vorkamen. Der Glycocoll-Nährboden ist in besonderem Maße für solche Stämme geeignet, die ursprünglich Roggen als Wirtspflanze hatten. Bei den Stämmen, deren Sklerotien auf anderen Gräsern gefunden wurden, scheint nach dem bisherigen, relativ kleinen Versuchsmaterial, der Glycocoll-Nährboden lediglich in dem Ausmaß geeignet zu sein, wie der von M.Abe (36) vorgeschlagene und die anderen von mir verwandten Standardnährböden. (Tabelle 19 c).

Da hier eine Klassifizierung der Stämme nach der Wirtspflanze, auf der sie aufgefunden wurden, erfolgte, sei in diesem Zusammenhang angeführt, daß R.Stäger (83) und V.Grasso (84) zwar eine Wirtsspezifität einzelner Mutterkornspecies und Rassen betonen, eine so strenge Einteilung nach den Untersuchungen von N.v.Bekesy (85) und R.Meinike (55) nicht aufrechtzuerhalten ist. Ein Wirtswechsel ist in weitem Maße möglich.

Via. Zur Sklerotienbildung in saprophytischer Kultur.

Neben dem zahlenmäßigen Vergleich der alkaloidbildenden Stämme zeigt auch die morphologische Entwicklung des Pilzes auf Glycocoll-Nährlösung die besondere Eignung des Nährbodens. Das Erscheinungsbild der in saprophytischer Kultur gewachsenen Mycelien ähnelt im Stadium der Abernte (s. Abschnitt II) in gewisser Weise dem der in parasitischen Kultur gewachsenen Sklerotien. Die Wuchsform der Mycelien der Glycocoll-Kulturen zeigt gegenüber der der übrigen Nährböden deutliche Abweichungen. Auf den oben erwähnten (Seite 13) vier Standardnährböden bildete der Pilz im Allgemeinen eine flache Myceldecke aus, die in manchen Fällen grob oder gekröseartig gefalten oder hügelartig aufgeworfen war. Bei stärkerer Acidität - P_H -Werte von 4,0 bis 4,8 - bildeten sich meist submerse, im Wachstum stagnierende häutchenartige Mycelien. Eine Abhängigkeit zwischen der Mycelform und P_H -Wert im Sinne von H.Kirchhoff konnte bei dem vorliegenden Material von etwa 10 000 Kulturen nicht

beobachtet werden. Bei den vier Standardnährböden ging das Wachstum des Mycels von einem oder mehreren Zentren auf der Flüssigkeitsoberfläche, besonders deren Rand aus. Danach erfolgte die Bildung einer gleichmäßig dichten Myceldecke, die sich im Laufe des Wachstums noch verstärkte.

Während bei den vorstehend erwähnten Nährböden 6 - 8 Tage nach Beimpfung das erste Mycel sichtbar wurde, war das bei den Glycocoll-Nährböden erst nach 14 Tagen der Fall. Zu diesem Zeitpunkt traten auf der Flüssigkeitsoberfläche gleichmäßig verteilt eine große Anzahl stecknadelkopfgroßer weißer Mycelien in Erscheinung. Sie wuchsen dann schnell bis sie einen Durchmesser von 5 - 6 mm erreichten und zusammenstießen, und so die ganze Flüssigkeitsoberfläche bedeckten. Durch weiteres Wachstum faltete sich die Myceldecke auf.

Die Unterschiede wurden besonders deutlich beim Abernten. Bei den vier Standardnährböden bildeten die Mycelien eine durch die Kolbenform bedingte kreisförmige Fläche, die beim Herausnehmen erhalten blieb. Ihr Radius war meist größer als der des Kolbens, wodurch die Faltung eintrat. In trockenem Zustand zeigten diese Mycelien meist lederartige Beschaffenheit. Die Mycelien der Glycocoll-Kulturen bildeten dagegen eine Anhäufung kugelig, nicht fest zusammenhängender Mycelien, die sich infolge ihrer ungleich größeren Härte in nassem und trockenem Zustand zwischen den Fingern zerkrümelten ließen.

Das mikroskopische Bild der auf Glycocoll-Nährlösung gewachsenen kugeligen Mycelien zeigte eine enge Hyphenverflechtung. Das pseudoparenchymatische Gewebe wies im Gegensatz zu den parasitisch gewachsenen Sklerotien häufiger Hohlräume auf. Im Allgemeinen war die Dicke der Myceldecke zu gering um im Querschnitt eine deutliche Differenzierung in eine violett gefärbte Rinden- und farblose Innenschicht erkennen zu lassen. In unserem Arbeitskreis konnten aus Glycocoll-Kulturen Mycelstücke isoliert werden, die eine Dicke bis zu 1 cm besaßen und deutlich in eine violett gefärbte Rindenschicht und ein ungefärbtes Innengewebe aufgeteilt waren. Das mikroskopische Bild der Gewebe entsprach dem der normalen Sklerotien. Die Übereinstimmung der auf Glycocoll-Nährlösung beobachteten Wuchsform des Pilzes im Aufbau und in der Verhärtung des Ge-

webes läßt die Bezeichnung Sklerotium richtig erscheinen. Ein endgültiger Beweis durch Nachweis der Fähigkeit zur Ausbildung von Geschlechtsorganen, wie G.Schweizer (13) es beschreibt, bleibt noch zu führen. Die Auffassungen über die Bezeichnungen der in saprophytischen Kulturen beobachteten Wuchsformen des Pilzes gehen in der vorliegenden Literatur auseinander. M.Abe (34) hält schon verhärtete Mycelstücke für Sklerotien oder eine ihrer Entwicklungsstufen, er schreibt wörtlich: "... that the "cortex-like layer" or the "artificial sclerotium".... is just a sclerotium itself or at least an intermediate in the course of its development." C.Engelke (4), W.W.Bonns (5) und H.Kirchhoff (8) bezeichnen kleine verhärtete Mycelabschnitte von etwa 1/4 mm Durchmesser als Mikrosklerotien. Eine Differenzierung des pseudoparenchymatischen Gewebes in Rinden- und Innenschicht wurde nicht beobachtet, das ganze Gewebe führte Farbstoff. Daher bezeichnete A.McCrea (10) ähnliche in ihren saprophytischen Kulturen aufgefundene Wuchsformen nur als Pseudosklerotien.

G.Gjerstad und E.Ramstad (30) führen die in ihren saprophytischen Kulturen ausgebliebene Alkaloidproduktion auf die fehlende Sklerotinisierung der Mycelien zurück. Sie versuchen ihre Ansicht durch weitere Untersuchungen an parasitisch gewachsenem Mutterkorn (86) zu stützen, nach der weiche und vom normalen Aussehen abweichende Sklerotien kein Alkaloid bildeten. Ihrer Ansicht kann man nicht ohne weiteres zustimmen, denn H.Raßbach (32) fand in nicht sklerotinisierten Mycelien von Pepton-Kulturen beachtliche Mengen Alkaloid. Abgesehen von den Mycelien der Glycocoll-Kulturen war bei den von mir untersuchten Kulturen auch bei Alkaloidbildung keine Sklerotinisierung zu beobachten. Außer den genannten Autoren betont lediglich G.Schweizer (13) die Notwendigkeit einer Sklerotinisierung für die Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur. Eine solche tritt aber nach seinen Angaben erst ein, wenn der Nährboden im Laufe der Kulturperiode durch enzymatische Vorgänge eine alkalische Reaktion annimmt. Das soll sich durch einen trimethylaminartigen Geruch bemerkbar machen. Seiner Ansicht nach ist das nur bei kaltsterilisierten Nährböden möglich.

H.Kirchhoff (8) hatte Mikrosklerotienbildung bei Zusatz

von Kalilauge zur Nährlösung oder auch dann beobachtet, wenn seine Gelatinekulturen infolge autolytischer Erscheinungen alkalische Reaktion annahmen. Er führt die Bildung der Mikrosklerotien auf die alkalische Reaktion zurück.

Bei den von mir verwandten, heißsterilisierten Nährlösungen blieb der P_H -Wert im Laufe der Kulturperiode im Bereich von 4,8 bis 6,0. Lediglich bei zu langer Kulturdauer trat durch Zersetzungserscheinungen eine Verschiebung des P_H -Wertes in den alkalischen Bereich ein. Nach Verbrauch der Kohlenstoffquelle baut nach M.Abe (30) der Pilz nicht nur sein Gewebe partiell ab, sondern auch die bereits gebildeten Alkaloide. Um zu überprüfen, ob die Alkaloidbildung durch Alkalisierung begünstigt wird, setzte ich 3 Wochen alten Kulturen Kaliumkarbonatlösung zu. Bis dahin hatte sich das Mycel bei einem P_H -Wert von 5,4 normal entwickelt. Eine Versuchsreihe wurde dann auf den P_H -Wert 8,0 und eine zweite auf den von 9,0 gebracht. Untersuchungen der Kulturfiltrate nach 14 Tagen und 3 Wochen ergaben, daß der Pilz, offenbar durch Säureabscheidung, den ursprünglichen P_H -Wert von 5,4 wiederhergestellt hatte. Lediglich die Nährböden nach M.Abe (36) wiesen noch alkalische Reaktion auf, aber auch hier wurde weder Sklerotinisierung noch Alkaloidbildung beobachtet.

In weiteren Versuchsreihen wurde Glycocoll-Kulturen mit Harnstoffzusatz nach 30 Tagen Kulturdauer Urease zugesetzt. Der P_H -Wert hatte sich nach 6 Tagen wieder auf den von 5,4 normalisiert, lediglich bei zwei von sechs Kolben einer Versuchsreihe wurde eine alkalische Reaktion festgestellt, aber keine Sklerotinisierungserscheinungen.

Da bei 150 Stämmen bei Kultur auf Glycocoll-Nährlösung eine deutliche Verhärtung des Mycels festgestellt werden konnte, während die Reaktion des Kulturfiltrates im Bereich der P_H -Werte von 5,2 bis 6,0 lag, kann die Annahme nicht bestätigt werden, daß eine Sklerotinisierung nur bei alkalischer Reaktion eintritt.

Zur Farbstoffbildung in saprophytischer Kultur.

M.Abe (34) nimmt einen Zusammenhang zwischen Farbstoffbildung und Alkaloidproduktion in saprophytischer Kultur an. Er

schreibt: "... production of the alkaloid ... is proportionate to the extent of the formation ... of the so-called ergot pigment." Die bei den Glycocoll-Kulturen beobachtete starke Farbstoffbildung läßt die Frage interessant erscheinen, ob eine solche Abhängigkeit tatsächlich besteht. Die Mycelien der Glycocoll-Kulturen waren bei 75 % der untersuchten Stämme violett gefärbt, davon waren nur ein Drittel alkaloidhaltig. Hervorzuheben ist, daß alle alkaloidbildenden Mycelien (25 % der untersuchten Stämme) auf Glycocoll-Nährboden Farbstoffbildung zeigten. Bei größeren Versuchsreihen mit dem Stamm WD 198 wiesen nur die violett gefärbten Mycelien Alkaloid auf, im Wachstum zurückgebliebene unpigmentierte Mycelien waren alkaloidfrei. Auch H. Raßbach (32) beobachtete bei Versuchen mit Pepton-Kulturen nur dann Alkaloidbildung, wenn das Mycel violett gefärbt war.

Bei den Kulturen mit den anderen vier Standardnährlösungen trat eine Farbstoffbildung weniger häufig auf. Die auf den einzelnen Nährböden Farbstoff bildenden Stämme sind zum Vergleich in der folgenden Tabelle 20 aufgeführt.

Nährboden	Alkaloidbildende Stämme		Gesamtzahl der farbstoffbildenden Stämme
	davon farbstoffbildend	davon nicht farbstoffbildend	
Anorganisch N	0	0	12
Pepton	1	2	8
Asparagin	5	3	15
Ammonsuccinat-Mannit	1	3	19
Glycocoll	50	0	153

Tabelle 20. Die Verteilung des Farbstoff- und Alkaloidbildungsvermögens bei den untersuchten 210 Stämmen.

Die in der Tabelle 21 aufgeführten Stämme bildeten auf den vier Standardnährböden zwar Alkaloid, aber keinen Farbstoff:

Stamm	Pepton		Asparagin		Ammonsucc.-Mannit		Glycocoll	
	Alka- loid	Farb- stoff	Alka- loid	Farb- stoff	Alka- loid	Farb- stoff	Alka- loid	Farb- stoff
El	o	o	A	o	o	o	A	V
Fe/Te	o	o	A	o	A	o	A	V
Mo T	A	V	A	o	A	o	o	o
U oo9	o	o	o	o	A	o	A	V
Mol 12	A	o	o	o	o	o	o	o
Mol 16	A	o	o	o	o	o	o	V

Zeichenerklärung:

A = Alkaloidbildend

V = Violettfärbung

Tabelle 21. Farbstoff- und Alkaloidbildung.

Nach den bisherigen Versuchen kann angenommen werden, daß im Allgemeinen auch bei der saprophytischen Kultur die Alkaloidbildung von einer Farbstoffbildung begleitet ist. Farblose Mycelien führten selten Alkaloid. Ein Vergleich der alkaloidhaltigen Leukosklerotien (87) mit den alkaloidhaltigen Leukomycelien ist allerdings nicht angebracht, da die Farbstoffbildung vom Nährboden abhängig ist. Die auf Asparagin-, Pepton- und Ammonsuccinat-Mannit-Nährböden farblose Mycelien bildenden Stämme El, Fe/Te, U oo9 und Mol 16 wiesen, wie Tabelle 21 zeigt, bei Kultur auf Glycocoll-Nährlösung violett gefärbte Mycelien auf.

Die Bedeutung des Glycocoll-Nährbodens.

Nimmt man die Sklerotinisierung, die Farbstoffbildung und die bei einem hohen Anteil der untersuchten Stämme auftretende Alkaloidbildung als Maßstab für die Eignung des Nährbodens, so zeigt sich die Brauchbarkeit des Glycocoll-Nährbodens für die saprophytische Kultur. Bei den bisher angewandten Nährböden wurde nur ein weiches, meist farbloses Mycel gebildet, das an das Sphaceliastadium erinnert, während die bei Glycocoll-Kulturen erreichten Wuchsformen dem Sklerotienstadium der parasitischen Kultur angeglichen sind. Der Wert des Glycocoll-Nährbodens liegt aber vor allem darin, daß auf ihm ein gegenüber anderen Nährböden besonders hoher Anteil von Stämmen zur Alkaloidbildung in der Lage ist. Der einfach zusammengesetzte Nährboden dürfte eine geeignete Grundlage für Untersuchungen über die Alkaloidbiosynthese von *Claviceps purpurea* abgeben.

Die Bedeutung des Glycocolls im Nährboden ist offensichtlich, denn allein mit Spurenelementen und einer anderen Stickstoffquelle wurde selten Alkaloidbildung erzielt, und die beschriebenen Mycelformen (Seite 41) nicht erreicht. Die charakteristischen Wuchsformen traten auch bei Ernährung mit Glycocoll ohne Spurenelementzusatz auf. Zur Erreichung des Zustandes scheint die C_2 -Aminosäure Glycocoll und deren alleinige Verwendung wichtig zu sein. In diesem Zusammenhang führt E.Thielmann (29) aus, daß die Darreichung von Aminosäuregemischen den Gaben einzelner Aminosäuren "überlegen" sei. Das scheint bei meinen Untersuchungen nur für das beginnende Mycelwachstum zuzutreffen. Das Wachstum des Mycels war bei Kulturen mit Aminosäuregemischen oder Pepton zunächst stets besser als bei Glycocoll-Kulturen. Bei den Glycocoll-Kulturen setzte aber nach 14 Tagen ein intensiveres Wachstum ein, so daß bei beiden Nährböden die Kulturdauer und das Mycelgewicht etwa gleich waren. E.Thielmann (29) kommt in ihrer Arbeit zu der Ansicht, daß kurzkettige Aminosäuren besser geeignet seien als langkettige. Sie verwendete Aminosäuren mit drei bis sechs Kohlenstoffatomen. Einschränkend ist hier zu bemerken, daß sich ihre Aussage nur auf das Mycelwachstum, aber nicht auf die Alkaloidbildung beziehen kann. Sie führte ihre Untersuchungen fast ausschließlich mit solchen Stämmen durch, die unter den gebotenen Bedingungen

nicht zur Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur in der Lage waren. Eigene Untersuchungen mit Glycocoll-Nährböden zeigten, daß damit noch höhere Mycelgewichte als bei Asparagin-Nährböden zu erreichen waren. Die gute Eignung des Glycocolls für die Mycel- und Alkaloidbildung läßt annehmen, daß der Pilz die Synthese seiner Körpersubstanz über sehr einfache organische Bausteine, hauptsächlich C_2 -Körper durchführt. Von höher organisierten Lebewesen ist z.B. bekannt, daß das Glycocoll bei der Synthese der Nucleoproteide direkt in deren Purinanteil eingebaut wird. Der Aufbau der Pyrrolringe der Porphyrinkörper, wie die Cytochrome, Katalase und Peroxydase, erfolgt aus zwei Molekülen Glycocoll. Nach dem augenblicklichen Stand der Kenntnis müssen wir bei den meisten Organismen einen Umbau der aufgenommenen Nahrungsstoffe über kurz-kettige Bruchstücke zu körpereigenen Substanzen annehmen. C_2 -Bruchstücke spielen z.B. in der Synthese der Fettsubstanzen in Form der "aktivierten" Essigsäure eine bedeutende Rolle, ebenso die Glycolsäure als Zwischenstufe der Kohlensäureassimilation. Es liegt die Vermutung nahe, daß der parasitisch lebende Pilz aus dem Säftestrom des Wirtes dessen intermediäre Stoffwechselprodukte in Form von C_2 -Körpern erhält und assimiliert. Lang-kettige Substanzen müssen offenbar erst bis zu dieser Form abgebaut werden und sind daher weniger leicht verwertbar. Die Annahme einer Versorgung des Parasiten mit C_2 -Körpern läßt die Erklärung zu, daß der Baustoffwechsel des Pilzes hauptsächlich auf Synthesen aus solchen Körpern eingestellt ist. Die für den Pilz typischen Stoffwechselleistungen wie z.B. Alkaloidbildung und Farbstoffbildung wären dann auch bei saprophytischer Kultur von einer solchen Versorgung abhängig. Sie scheint durch die Ernährung mit Glycocoll gegeben zu sein.

Nachdem die Untersuchungen die gute Eignung von Glycocoll ergeben hatten, versuchte ich den für die Alkaloidbildung günstigsten C/N-Quotienten festzustellen. Ich war bisher von einer Stickstoffkonzentration ausgegangen, die der der anderen Nährlösungen entsprach. Unter dem gleichen Gesichtspunkt wurde auch die Konzentration der Mineralsalze bzw. Spurenelemente überprüft.

Veränderungen der Glycocollkonzentration ergab in Kultur-
reihen zu je 6 Kolben keine signifikant höhere Alkaloidaus-
beute. Ebenso erwies sich in gleich großen Versuchsreihen
keine Spurenelementkonzentration besser geeignet. Die Ergeb-
nisse sind in Tabelle 23 und 24 zusammengefaßt.

Stamm	Nährlösung	Glycocoll- konzentrat.	C/N- Quotient	Anzahl der Kolben	Alkaloid- gehalt p. Kolben
WD 198	10 % Dextrose	0,25 %	63	6	2,58 mg
	5 % Spuren- element- lösung	0,5 %	37	6	2,65 mg
		0,75 %	27	6	1,12 mg
		1,0 %	22	6	0,0 mg

Tabelle 23. Durchschnittlicher Alkaloidgehalt pro Kolben
bei Änderung der Glycocollkonzentration.

Stamm	Nährlösung	Spurenelement- konzentration	Anzahl der Kolben	Alkaloid- gehalt p. Kolben
WD 198	10 % Dextrose	25 ml/l	6	0,44 mg
	0,5 % Glycocoll	50 ml/l	6	2,65 mg
		75 ml/l	6	3,05 mg
		100 ml/l	6	2,25 mg

Tabelle 24. Durchschnittlicher Alkaloidgehalt bei Änderung
der Spurenelementkonzentration.

Als Kohlenstoffquelle wurde durchweg Dextrose verwandt,
sie hatte sich bei den Untersuchungen von H. Raßbach (32) als
gut geeignet erwiesen. Bei Verwendung von Maltose oder Mannit
an Stelle der Dextrose bei Glycocoll-Nährlösungen wurde in
kleinen Versuchsreihen schlechtes Wachstum (Mycelgewichte un-

ter 0,1 g) und keine Alkaloidbildung beobachtet. Ein Ersatz der Dextrose durch Saccharose erscheint nach den Ergebnissen kleiner Versuchsreihen möglich. Eine Herabsetzung der Kohlehydratmenge pro Kolben ergab geringere Mycel- und Alkaloidausbeuten wahrscheinlich durch das geringere Nährstoff- und Energieangebot. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 und 26 zusammengefaßt.

Stamm	Nährlösung 85 ml	Dextrose- konzentr.	C/N- Quotient	Anzahl der Kolben	Mycel- gewicht	Alkaloid- gehalt p. Kolben
WD 198	Glycocoll	2,5 %	10,5	6	0,6 g	0,0
	0,5 %	5,0 %	19,5	6	1,1 g	0,40 mg
	Spurenelement- lösung	7,5 %	28,5	6	1,4 g	0,94 mg
	5 %	10,0 %	37,5	6	2,6 g	2,65 mg

Tabelle 25. Durchschnittlicher Alkaloidgehalt bei Änderung der Dextrosekonzentration.

Stamm	Nährlösung 85 ml	Saccharose- konzentrat.	C/N- Quotient	Anzahl der Kolben	Mycel- gewicht	Alkaloid- gehalt p. Kolben
WD 198	Glycocoll	2,5 %	11	5	0,6 g	0,0
	0,5 %	5,0 %	20,4	6	1,7 g	0,57 mg
	Spurenelement- lösung	7,5 %	30	6	1,6 g	0,36 mg
	5 %	10,0 %	39	4	3,0 g	2,24 mg

Tabelle 26. Durchschnittlicher Alkaloidgehalt bei Ersatz der Dextrose durch Saccharose verschiedener Konzentrationen.

Schlußdiskussion.

Erwartungsgemäß haben die Untersuchungen gezeigt, daß das in parasitischer und saprophytischer Kultur gebildete Alkaloidgemisch qualitativ und quantitativ gleich zusammengesetzt ist, und daß in saprophytischer Kultur echte Sklerotien gebildet werden können. Daraus darf geschlossen werden, daß das Stoffwechselgeschehen und somit auch die Alkaloidbildung bei beiden Kulturarten weitgehend gleichartig abläuft. Danach müßten Stämme mit der Fähigkeit zur Alkaloidbildung in parasitischer Kultur grundsätzlich auch zur Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur befähigt sein, wenn ihnen die geeigneten Kulturbedingungen geboten werden. Es gelang zwar, einen geeigneten Nährboden aufzufinden, aber die Konstanz der Alkaloidbildung scheint noch von anderen Faktoren abzuhängen. Die Untersuchungen zeigen, daß das Ausmaß der Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur sich noch in gewisser Weise einer Kontrolle entzieht. Immer wieder war festzustellen, daß Wiederholungen der Versuche sowohl im Kleinen als auch im Großen zu abweichenden Ergebnissen führten, die das Maß der üblichen biologischen Streuung überschritten.

Einige der hierfür möglicherweise verantwortlichen Ursachen seien hier nochmals kurz angeführt. So bleibt zu klären, ob die im Kulturfiltrat angesammelten Stoffwechselprodukte einen fördernden oder hemmenden Einfluß auf die Alkaloidproduktion ausüben. Im letzteren Fall müßte die Kultur entweder in einem kontinuierlich zu erneuernden, fließenden Medium durchgeführt werden, oder auf diskontinuierlich zu erneuernden Nährlösungen, wie sie M.Abe (41,42) als "surface replacement cultures" beschreibt.

Eine weitere Ursache der schwankenden Ergebnisse kann in einer möglichen Uneinheitlichkeit der Stämme liegen. Es liegt im Bereich des Möglichen, daß bei fortlaufender vegetativer Vermehrung die ursprünglichen Wildpopulationen sich entmischen und die darin enthaltenen Biotypen ein abweichendes Verhalten zeigen. Aber auch die Kulturen der Klonstämme K 90, Mol 12, Mol 16 und Mol 20 zeigten starke Streuungen im Alkaloidgehalt. Das macht eine Untersuchung der genetischen Einheitlichkeit

der vegetativen Nachkommenschaft einer einzelnen Konidie notwendig.

Die Bearbeitung des Problems wurde bereits in unserem Arbeitskreis aufgegriffen. Sie zeigte, daß die Konidiosporen aus Honigtau und aus saprophytischen Kulturen des Klonstammes K 90 in der Masse einkernig sind (89).

Der biologische Zustand der Mycelien einer Versuchsreihe soll möglichst einheitlich sein. Hierzu sind zunächst einmal Untersuchungen zur Charakterisierung des physiologischen Verhaltens der einzelnen Entwicklungsstadien, von der Konidie bis zum sklerotinierten Mycel, notwendig. In diesem Zusammenhang vertritt J.de Tempe (15) die Auffassung, daß sich nur schwimmende Konidien an der Bildung des Oberflächenmycels beteiligen. Eigene Beobachtungen zeigten ebenfalls, daß die Konidien zunächst an der Oberfläche der Ruhekultur kleine runde Mycelien bildeten. Dabei konnte noch nicht entschieden werden, ob die Konidien beim Einbringen des Impfmycelfetzens trotz Umschüttelns des Kolbens an der Flüssigkeitsoberfläche verblieben waren, oder nach Ablösen vom untergetauchten Mycelfetzen zur Oberfläche aufgestiegen waren. Daher erscheinen weitere Untersuchungen über die Sauerstoffbedürftigkeit des Pilzes in den einzelnen Entwicklungsstadien angezeigt.

Abschließend sei nochmals auf die Möglichkeit eines Alkaloidabbaus in saprophytischer Kultur hingewiesen. Inwieweit und mit welcher Geschwindigkeit die Alkaloide im Mycel und in der Nährlösung abgebaut werden, und welche Möglichkeiten bestehen, das Geschehen zu steuern, wäre noch zu untersuchen. Ob in saprophytischer Kultur bei manchen Stämmen das gebildete Alkaloid schneller abgebaut wird, und die Stämme dadurch alkaloidfrei erscheinen, wie es H.D.Michener und N.Snell (17) annehmen, wäre nachzuprüfen. Ein unterschiedlich starker Auf- und Abbau des Alkaloids in den einzelnen Entwicklungsstadien könnte die starken Streuungen des Alkaloidgehaltes erklären.

Zusammenfassung.

Die von acht *Claviceps purpurea*-Stämmen in saprophytischer und parasitischer Kultur gebildeten Alkaloide wurden chromatographisch verglichen. Die Stämme bildeten bei beiden Kulturarten die gleichen Alkaloide. Daraus konnte abgeleitet werden, daß die Fähigkeit zur Bildung bestimmter Alkaloide erblich gebunden ist, und der Kulturart dabei untergeordnetere Bedeutung zukommt.

Eine Reihe von *Claviceps*stämmen wurde auf vier bekannten Nährböden (nach R.Jaretsky (11), M.Abe (36), H.Kirchhoff (8)) auf ihre Fähigkeit geprüft, in saprophytischer Kultur Alkaloid zu bilden. Von 210 Stämmen waren nur 12 auf den genannten Nährböden dazu in der Lage.

Auf der Suche nach geeigneteren Kulturmedien wurden verschiedene Aminosäuren, Säureamide, Eiweißhydrolysate und Bierwürze auf ihre Brauchbarkeit als Stickstoffquellen bei der Alkaloidbildung von *Claviceps* in saprophytischer Kultur untersucht. Dazu wurden die oben erwähnten 12 Stämme verwandt. Während Eiweißhydrolysate, Bierwürze und Aminosäuregemische sich als wenig brauchbar erwiesen, trat bei Nährböden mit kurzkettigen Aminosäuren bei einem großen Teil der Stämme Alkaloidbildung ein.

Die wiederholte saprophytische Kultur von 30 alkaloidbildenden Stämmen auf gleichen Nährböden erbrachte stark voneinander abweichende Alkaloidausbeuten. Auch innerhalb einer Versuchsreihe streuten die Ausbeuten stark. Versuche, die Alkaloidgehaltsschwankungen durch Zusatz bestimmter Aminosäuren, Kältebehandlung oder Kulturwechsel auszuschalten, führten nicht zu dem gewünschten Erfolg. Die vermutlichen Gründe für die unterschiedlichen Alkaloidausbeuten wurden diskutiert.

Zur Erreichung konstanter Kulturbedingungen wurde nach einem chemisch definierten Nährboden gesucht. Von den zahlreichen untersuchten Nährstoffkombinationen war eine Mischung von Glycocoll, Dextrose und einer Reihe von Mineralsalzen am besten geeignet. Während bei den bisherigen Nährböden nur 4 % der untersuchten Stämme Alkaloid bildete, waren auf der Glycocoll-Nährlösung dazu 50 von 210 Abimpfungen (Stämme) in der

Lage. Die bei den Kulturen auf Glycocoll-Nährlösungen beobachtete Sklerotinisierung und starke Farbstoffbildung wurden in ihrer Bedeutung für die Alkaloidproduktion diskutiert.

Experimenteller Teil

1. Allgemeine Technik der Anlage saprophytischer Kulturen.

1,1 Sterilisationstechnik.

Die Schrägagarnährböden in Reagensgläsern von 20 mm Durchmesser und 200 mm Länge und die Flüssigkulturen in Erlenmeyerkolben von 300 ml Volumen wurden mit Stopfen aus nicht brennbarer Watte verschlossen. Sie wurden mit Wasserdampf von 110° und 0,4 atü 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert.

Lediglich bei einer Versuchsreihe wurde der als Nährboden dienende verdünnte Honigtau durch Seitz-Entkeimungsfilter mit Unterdruck sterilfiltriert. Filter, Druckgefäß und die zur Kultur dienenden Erlenmeyerkolben wurden vorher mit Wasserdampf von 110° 20 Minuten sterilisiert. Das Ablaufrohr des Seitz-Filters war durch ein Glasrohr verlängert, das zur Kapillare ausgezogen war. Diese war durch den Watteverschluß des Kulturgefäßes gesteckt. So konnte direkt in dieses hineinfiltriert werden, und der sterile Verschluß des Kolbens blieb beim Herausziehen des Filters erhalten.

1,2 Anlage von Schrägagarkulturen aus Sklerotien.

Von den Sklerotien wurde eine Hälfte zur Analyse verwandt und die andere in einer Aethanol-Formalin-Mischung (2+1) desinfiziert. Aus ihrem Inneren wurden mit sterilem Skalpell in einer ultraviolett ($\lambda = 254\mu\mu$) ausgeleuchteten Impfkabine aseptisch Gewebestückchen entnommen. Sie wurden auf die feuchte Oberfläche von frischen Schrägagarnährböden gebracht und dort bei Zimmertemperatur auskeimen gelassen.

1,3 Impftechnik.

Zur Beimpfung der Flüssigkulturen wurden Mycelfetzen von ca. $0,5 \text{ cm}^2$ Größe den Schrägagarkulturen von 3 - 4 Wochen Alter entnommen. Die Konidien wurden nach Einbringen des Gewebes in die Nährlösung durch Schütteln des Kolbens abgeschwemmt.

In Abständen von etwa einem Monat erfolgte Überimpfung der einzelnen Pilzstämme auf frische Schrägagarröhrchen. Hierbei wurden nur die Konidien eines Mycelfetzens von $0,5 \text{ cm}^2$ Größe

auf der feuchten Oberfläche der Folgekultur abgestreift und der Mycelfetzen verworfen.

Die Anzahl der Konidien pro Mycelflächeneinheit wurde in Abhängigkeit vom Alter der Schrägagarkulturen bestimmt. Einmal wurde eine Konidiensuspension in der Thomae-Zählkammer ausgezählt, die durch einfaches Abschwemmen von 1 cm^2 Myceloberfläche mit 1 ml Wasser erhalten wurde. Vergleichsweise wurde versucht, die Konidien durch Verreiben mit Wasser im Mörtel vom Mycel zu trennen. Die Proben wurden sowohl vom oberen, als auch vom unteren Ende der Schrägagarkultur entnommen.

Stamm	Alter der Kultur	Anzahl der Konidien von	
		1 cm^2 Mycel mit 1 ml H_2O abgeschwemmt oberes unteres Ende des Schrägagars	1 cm^2 Mycel mit 1 ml H_2O verrieben.
WD 20	16^d	o	o
	25^d	$127 \cdot 10^6$	$152 \cdot 10^6$
	32^d	$8,8 \cdot 10^6$	$8,8 \cdot 10^6$
	46^d	$12,8 \cdot 10^6$	-

1,4 Aufbewahrung der saprophytischen Kulturen.

Die Flüssig- und Schrägagarkulturen wurden in einem halbdunklen Kellerraum bei durchschnittlich 20°C aufbewahrt. Die Luftfeuchtigkeit wurde auf 60 - 80 % des Sättigungswertes gehalten.

1,5 Aberntetechnik.

1,51 Kulturdauer.

Die in den Flüssigkulturen gewachsenen Mycelien wurden nach 40 - 50 Tagen abgeerntet. Die Dichte des Kulturfiltrates lag unter 1,01. Die Bestimmung des Dextrosegehaltes im Kulturfiltrat nach Th.M.v.Fellenberg (91) ergab zu diesem Zeitpunkt folgende Werte:

Stamm	Alter	Anfangs P _H	End- P _H	Dichte	Dextrose- gehalt	Nährboden
53 St	40 ^d	5,7	7,2	1,006	0,14 %	Pepton- 2 % Dextrose 10 %
53 St	40 ^d	5,7	7,0	1,005	0,14 %	
53 St	40 ^d	5,7	6,0	1,005	0,10 %	
53 St	40 ^d	5,7	5,4	1,006	0,40 %	

1,52 Aberntetechnik und Trocknung der Mycelien.

Die Mycelien wurden vom oft schleimigen Kulturfiltrat mittels eines Drahtsiebes (No. VI des DAB VI) getrennt, zwischen Filtrierpapier abgepresst und drei Tage an der Luft getrocknet. Das Kulturfiltrat wurde sofort aufgearbeitet.

2. Reinheit der Substanzen.

Die verwandten anorganischen Stoffe waren "pro analysi" Merck-Substanzen. Die Aminosäuren, das Mannit, die Kohlehydrate und die organischen Lösungsmittel entsprachen dem Reinheitsgrad "purum" Merck, die Dextrose den Anforderungen des DAB VI. Zu chromatographischen Untersuchungen wurden Substanzen verwandt, deren Reinheit den Chemikalien "Zur Chromatographie"-Merck entsprach.

3. Zusammensetzung der Nährböden.

3,1 Schrägagarröhrchen.

20,0 Agar-Agar DAB VI wurden mit einem Liter destilliertem Wasser 24 Stunden vorgequollen und das überschüssige Wasser abgepreßt. Der wurde mit

Kaliumdihydrogenphosphat	1,0 g
Magnesiumsulfat	0,25 g
Pepton aus Fleisch, tryptisch abgebaut, Merck 38 073	20,0 g

Dextrose 100,0 g
und destilliertem Wasser zu 1000,0 g
Die Substanzen wurden im Dampfbad bis zur klaren Lösung erwärmt und jeweils 12 ml in Reagensgläser von 20 mm Durchmesser und 200 mm Länge eingefüllt. Nach dem Sterilisieren wurden sie in Schräglage erkalten gelassen.

3,2 Flüssigkulturen.

3,21 Grundnährböden.

3,211 Nährboden nach H.Kirchhoff (8)

Kaliumdihydrogenphosphat	1,0 g
Magnesiumsulfat	0,25 g
Kaliumnitrat	0,5 g
Calciumnitrat	1,0 g
Ammoniumchlorid	0,25 g
Dextrose	50,0 g
Dest. Wasser	bis 1000,0 ml

3,212 Pepton-Nährlösung nach R.Jaretsky (11)

Kaliumdihydrogenphosphat	1,0 g
Magnesiumsulfat	0,25 g
Pepton aus Fleisch, tryptisch abgebaut, Merck 38 073	20,0 g
Dextrose	100,0 g
Dest. Wasser	bis 1000,0 ml

3,213 Asparagin-Nährlösung nach R.Jaretsky (11)

Kaliumdihydrogenphosphat	1,0 g
Magnesiumsulfat	0,25 g
L(-)-Asparagin	10,0 g
Dextrose	100,0 g
Dest. Wasser	bis 1000,0 ml

3,214 Ammoniumsuccinat-Mannit-Nährlösung nach M.Abe (34)

Kaliumdihydrogenphosphat	1,0 g
Magnesiumsulfat	0,25 g

Ammoniumsuccinat	7,0 g
Mannit	50,0 g
Dest. Wasser	bis 1000 ml

Die Lösung wurde mit Ammoniak auf einen P_H -Wert von 5,4 eingestellt.

Jeweils 1 Liter der aufgeführten Nährlösungen wurde für sechs Kulturen in Erlenmeyerkolben von 300 ml Volum verwandt.

- 3,22 Variationen des Nährbodens.
 3,221 Variationen der Stickstoffquelle.

Einer Grundnährlösung von

Kaliumdihydrogenphosphat	1,0 g
Magnesiumsulfat	0,25 g
Dextrose	100,0 g
Dest. Wasser	bis 1000,0 ml

wurden folgende Stickstoffverbindungen zugefügt und gegebenenfalls mit Natriumkarbonat auf den P_H -Wert von 5,4 eingestellt:

- | | | | |
|-----------------------|--------|---------------------|--------|
| 1. L(+)-Glutaminsäure | 10,0 g | 6. Harnstoff | 2,0 g |
| 2. L(+)-Glutaminsäure | 5,0 g | 7. Glycocoll | 5,0 g |
| | | Pepton | 10,0 g |
| 3. Glycocoll | 5,0 g | 8. Ammoniumpyruvat | 2,0 g |
| 4. Glycocoll | 2,5 g | 9. Ammoniumtartrat. | 5,0 g |
| L(+)-Glutaminsäure | 5,0 g | | |
| 5. Glycocoll | 2,5 g | | |
| L(-)-Asparagin | 5,0 g | | |

10. Säurehydrolytisch abgebautes Pepton.

20,0 Pepton aus Fleisch, tryptisch abgebaut, Merck 38 073, wurden mit 250 ml 20%-iger Salzsäure 24 Stunden unter Rückfluß gekocht. Die Salzsäure wurde durch Einengen im Vakuum weitgehend entfernt, der verbleibende Sirup mit 500 ml Wasser aufgenommen und mit 10,0 Aktivkohle aufgeköcht. Nach Abfiltrieren wurden 1,0 g Tricalciumphosphat und 0,25 g Magnesiumsulfat zugesetzt und mit Kaliumkarbonat auf den P_H -Wert von 5,4 eingestellt. Mit 100,0 g Dextrose wurde daraus nach Verdünnen mit Wasser 1 Liter Nährlösung hergestellt.

11. Abbau von Gliadin aus Roggen.

250,0 g feingemahlene Roggenkörner wurden mit einem Liter 70%-igem Aethanol perkoliert.

Säurehydrolytischer Abbau.

Von der Hälfte des gliadinhaltigen Perkolates wurde der Alkohol i.V. abgezogen und der Rückstand mit 250 ml 20%-iger Salzsäure 12 Stunden unter Rückfluß gekocht. Die Salzsäure wurde im Vakuum weitgehend abgedampft. Der Rückstand wurde in 250 ml Wasser aufgenommen, mit 5,0 g Aktivkohle aufgeköcht und abfiltriert. Das Filtrat wurde nach Zusatz von 1,0 g Tricalciumphosphat und 0,25 g Magnesiumsulfat mit Kaliumkarbonat auf den P_H -Wert von 5,4 eingestellt.

Tryptischer Abbau.

Von der anderen Hälfte des Perkolates wurde ebenfalls der Alkohol i.V. abgezogen und der Rückstand in 500 ml 0,2%-iger Kaliumkarbonatlösung aufgeschwemmt. Der Ansatz wurde mit 1,0 ml Chloroform und 0,5 ml Toluol konserviert und mit 0,5 g Trypsin (Merck) 10 Tage bei 37°C hydrolysiert. Durch Einengen auf dem Wasserbad wurde danach das restliche Trypsin inaktiviert und das Chloroform und Toluol entfernt. Die Lösung wurde mit 1,45 g Phosphorsäure (= 5,8 g Phosphorsäure DAB VI) auf den P_H -Wert von 5,4 eingestellt und 0,25 g Magnesiumsulfat zugesetzt.

Die Lösungen der Abbauprodukte wurden nach Zusatz von je 100 g Dextrose und Auffüllen mit Wasser auf 1 Liter als Nährlösungen verwandt.

3,222 Bierwürze.

Frische Bierwürze, die mir freundlicherweise von der Mainzer Aktienbrauerei zur Verfügung gestellt wurde, wurde mit Wasser auf eine Dichte von 1,02 verdünnt und je 100 ml in Erlenmeyerkolben von 300 ml Fassungsvermögen heißsterilisiert.

3,223 Honigtau.

Der Honigtau wurde Anfang Juli 1955 von einem Feld des Mutterkornanbaus in Mainz gesammelt. Nach Verdünnen mit Wasser auf das

doppelte Volumen wurden die Konidien abzentrifugiert. Der Honigtau enthielt 33 % eiweißfreien Trockenrückstand. Er wurde auf das dreifache seines ursprünglichen Volums mit Wasser verdünnt, die Dichte betrug dann 1,037. Ein Teil der Lösung wurde kalt durch Filtration (Seitzfilter), ein anderer Teil bei 110° in Wasserdampf von 0,4 atü 20 Minuten sterilisiert. Je 30 ml verdünnter Honigtau wurde in Erlenmeyerkolben von 100 ml Fassungsvermögen gefüllt.

3,224 Spurenelementzusatz.

Spurenelementlösung nach G.Beadle und E.Tatum (63), modifiziert:

			enthält in 50 ml:
Kaliumdihydrogenphosphat	20,0 g		225 mg P
Magnesiumsulfat	5,0 g		25 mg Mg
Ammoniumnitrat	10,0 g		175 mg N
Calciumchlorid	1,0 g		18 mg Ca
Zinksulfat	88,1 mg		1 mg Zn
Kupfersulfat	3,92 mg		50 µg Cu
Manganchlorid	0,72 mg		10 µg Mn
Ammoniummolybdat	0,37 mg		10 µg Mo
Cobaltnitrat	0,98 mg		10 µg Co
Natriumtetraborat	0,88 mg		5 µg B
Dest. Wasser	bis 1000 ml		
Eisensulfat	1,0 g		10 mg Fe

jeweils getrennt zuzusetzen.

Einer Grundnährlösung von

Spurenelementlösung	50,0 ml
Dextrose	100,0 g
Dest. Wasser	bis 1000,0 ml

wurden folgende Stickstoffverbindungen zugesetzt:

1. Pepton aus Fleisch, tryptisch abgebaut, Merck 38 073 20,0 g
2. L-Asparagin 10,0 g
3. L(+)-Glutaminsäure 10,0 g + Na₂CO₃ bis P_H=7

4.	L(+)-Glutaminsäure L(-)-Asparagin	5,0 g 5,0 g	+ Na ₂ CO ₃ bis P _H =5,4
5.	Sarkosin	5,0 g	
6.	L(-)-Serin	0,8 g	
7.	L(-)-Leucin	4,0 g	
8.	Harnstoff	2,0 g	
9.	Ammoniumpyruvat	5,0 g	
10.	L(+)-Glutaminsäure Glycocoll	5,0 g 2,5 g	+ Na ₂ CO ₃ bis P _H =5,4
11.	Glycocoll	5,0 g	
12.	Glycocoll L(-)-Asparagin	2,5 g 5,0 g	
13.	Glycocoll Pepton 38 073	5,0 g 10,0 g	
14.	Glycocoll L(-)-Oxyprolin	5,0 g 0,5 g	
15.	Glycocoll L(-)-Prolin	5,0 g 1,0 g	
16.	Glycocoll L(-)-Tyrosin	5,0 g 0,2 g	
17.	Glycocoll L(-)-Tyrosin	5,0 g 0,4 g	
18.	Glycocoll D,L - Tryptophan	5,0 g 0,2 g	
19.	Glycocoll D,L - Tryptophan	5,0 g 0,5 g	
20.	Glycocoll D,L - Tryptophan	5,0 g 1,0 g	
21.	Glycocoll D,L - Tryptophan L(-)-Tyrosin	5,0 g 1,0 g 0,2 g	
22.	Glycocoll D,L - Tryptophan L(-)-Tyrosin	5,0 g 0,2 g 0,4 g	
23.	Ohne weitere Stickstoffquelle		Modifikation der Nähr- lösung nach H.Kirchhoff (8)

24.	Ammoniumsuccinat	7,0 g	Modifikation der
	D(-)-Mannit	50,0 g	Nährlösung
	(an Stelle der Dextrose)		nach M.Abe (34)

Variation der Glycocoli-Nährlösung.

Glycocoli	5,0 g
Spurenelementlösung	50,0 ml
Dextrose	100,0 g
Dest. Wasser	bis 1000,0 ml

Variation der Glycocolikonzentration.

1.	Glycocoli	2,5 g
2.	"	5,0 g
3.	"	7,5 g
4.	"	10,0 g

Variation des Spurenelementzusatzes.

5.	Spurenelementlösung	25 ml
6.	"	50 ml
7.	"	75 ml
8.	"	100 ml

Variation des Kohlehydrates.

9.	Dextrose	25,0 g	17.	Saccharose	25,0 g
10.	"	50,0 g	18.	"	50,0 g
11.	"	75,0 g	19.	"	75,0 g
12.	"	100,0 g	20.	"	100,0 g
13.	Maltose	25,0 g	21.	Mannit	25,0 g
14.	"	50,0 g	22.	"	50,0 g
15.	"	75,0 g			
16.	"	100,0 g			

3,225 Alkalisierung des Nährbodens.

Zur Bestimmung der erforderlichen Alkalimenge wurden aus den Kulturreihen am 23. Tag zwei normal gewachsene Kolben herausgenommen. Das Kulturfiltrat wurde mit einer n-Kaliumkarbonatlösung unter Verwendung einer Glaselektrode Modell Phywe auf den P_H -Wert 8,0 und auf 9,0 titriert. Die jeweils für die einzelnen Nährböden im Durchschnitt ermittelten Kaliumkarbonatmengen wurden in 5ml Wasser gelöst, bei 110° 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert, und jeweils zwei Kolben der betreffenden Kulturreihe zugesetzt. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle auf Seite 66

Fermentative Alkalisierung.

Zu zwei Versuchsreihen, deren Glycocoll-Nährlösung 0,2 bzw. 0,4 % Harnstoff enthielt, wurde am 30. Tage nach Kulturbeginn je 0,01 g Urease (Dr.Schuchardt, München) zugesetzt.

Stamm	Nährboden	Anfangs- P _H -Wert	Zusatz an K ₂ CO ₃ pro Kolben	P _H - Wert	Zeit- punkt	Ernte	End- P _H -Wert
Col 9	Anorg. N	5,2	135 mg	8,0	23 ^d	38 ^d	5,4
Col 9	"	5,2	135 mg	8,0	23 ^d	45 ^d	5,4
Col 9	"	5,2	155 mg	9,0	23 ^d	38 ^d	5,7
Col 9	"	5,2	155 mg	9,0	23 ^d	45 ^d	5,7
3a/10	Anorg. N	5,2	135 mg	8,0	23 ^d	38 ^d	5,7
3a/10	"	5,2	135 mg	8,0	23 ^d	45 ^d	5,3
3a/10	"	5,2	155 mg	9,0	23 ^d	38 ^d	5,7
3a/10	"	5,2	155 mg	9,0	23 ^d	45 ^d	5,7
Col 9	Pepton	5,7	225 mg	8,0	23 ^d	38 ^d	5,7
Col 9	"	5,7	225 mg	8,0	23 ^d	45 ^d	6,0
Col 9	"	5,7	315 mg	9,0	23 ^d	38 ^d	5,7
Col 9	"	5,7	315 mg	9,0	23 ^d	45 ^d	7,2
3a/10	Pepton	5,7	225 mg	8,0	23 ^d	38 ^d	5,7
3a/10	"	5,7	225 mg	8,0	23 ^d	45 ^d	6,0
3a/10	"	5,7	315 mg	9,0	23 ^d	38 ^d	6,0
3a/10	"	5,7	315 mg	9,0	23 ^d	45 ^d	6,0
Col 9	Asparagin	5,2	180 mg	8,0	23 ^d	38 ^d	5,7
Col 9	"	5,2	180 mg	8,0	23 ^d	45 ^d	5,4
Col 9	"	5,2	215 mg	9,0	23 ^d	38 ^d	5,7
Col 9	"	5,2	215 mg	9,0	23 ^d	45 ^d	5,4
3a/10	Asparagin	5,2	180 mg	8,0	23 ^d	38 ^d	5,7
3a/10	"	5,2	180 mg	8,0	23 ^d	45 ^d	5,4
3a/10	"	5,2	215 mg	9,0	23 ^d	38 ^d	5,7
3a/10	"	5,2	215 mg	9,0	23 ^d	45 ^d	5,4
Col 9	Abe	5,2	485 mg	8,0	23 ^d	38 ^d	8,0
Col 9	"	5,2	485 mg	8,0	23 ^d	45 ^d	8,0
Col 9	"	5,2	670 mg	9,0	23 ^d	38 ^d	8,0
Col 9	"	5,2	670 mg	9,0	23 ^d	45 ^d	8,0
3a/10	Abe	5,2	485 mg	8,0	23 ^d	38 ^d	8,0
3a/10	"	5,2	485 mg	8,0	23 ^d	45 ^d	8,0
3a/10	"	5,2	670 mg	9,0	23 ^d	38 ^d	8,0
3a/10	"	5,2	670 mg	9,0	23 ^d	45 ^d	8,0

Wasserstoffionenkonzentration saprophytischer Kulturen nach
Zusatz von Kaliumkarbonat.

Stamm	Nährlösung	Urease- zusatz	P _H -Wert	
			vor Zusatz am 30. Tag	Bei Abernte am 36. Tag
WD 198	Glycocoll 0,2 % Harnstoff	10 mg	5,4	5,4
		10 mg	5,4	5,4
		10 mg	5,4	4,6
		10 mg	5,4	4,8
		10 mg	5,4	4,8
		10 mg	5,4	4,8
WD 198	Glycocoll 0,5 % Harnstoff	10 mg	5,4	5,7
		10 mg	5,4	5,4
		10 mg	5,4	5,7
		10 mg	5,4	7,0
		10 mg	5,4	8,0
		10 mg	5,4	8,0

4. Allgemeine analytische Methoden.

4,1 Bestimmung des Alkaloidgehaltes.

4,11 Qualitative Prüfung.

4,111 Im Kulturfiltrat.

25 ml Kulturfiltrat wurden mit Ammoniak auf den P_H-Wert 8,0 eingestellt und zweimal mit je 25 ml frischdestilliertem Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die Trennung der oft auftretenden Emulsion konnte meist durch Zusatz von wenig Alkohol erreicht werden, oder sie mußte durch viertelstündiges Zentrifugieren bei 3000 U/min bewerkstelligt werden. Die vereinigten Methylenchloridphasen wurden im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in 1,0 ml Eisessig aufgenommen und mit 4,0 ml wässriger, 2%-iger Weinsäurelösung verdünnt. Als qualitativer Alkaloidnachweis diente einmal die weiße Trübung oder Fällung nach Versetzen von 1,0 ml dieser Lösung mit 5 Tropfen Mayers Reagens. Zum anderen die Blaufärbung innerhalb von 15 Minuten bei Versetzen von 2,0 ml der Lösung mit 4,0 ml Reagens nach H.W.van Urk (56), (modifiziert).

Zusammensetzung: p-Dimethylaminobenzaldehyd 0,2 g
(farblos, Merck)
Schwefelsäure 65%-ig V/V 100,0 ml
Eisen III chloridlösung DAB VI 1 Tropfen

Das Reagens wurde täglich frisch bereitet.

Versuche zur direkten Alkaloidbestimmung im Kulturfiltrat.

2,0 ml Kulturfiltrat wurden mit 4,0 ml Reagens nach van Urk versetzt, und die Verfärbung innerhalb von 15 Minuten beobachtet. Vergleichsweise wurden die in Tabelle 16 aufgeführten Ergebnisse mit dem oben beschriebenen Ausschüttelverfahren überprüft.

4,122 Im Mycel.

0,2 g lufttrockenes Mycel wurden mit Seesand verrieben, da bei der oft lederartigen Beschaffenheit des Trockenmycels einfaches Verreiben im Mörtel nicht zum Ziele führte. Das Pulver wurde 12 Stunden mit 10 ml methanolisch-wässriger Weinsäurelösung

d-Weinsäure	2,0 g
Methanol	49,0 ml
Dest. Wasser	49,0 ml

maceriert. Das Filtrat wurde mit Ammoniak auf den P_H -Wert 8,0 eingestellt und mit 20 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die Methylenchloridphase wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit 0,2 ml Eisessig aufgenommen und mit 1,8 ml 1%-iger wässriger Weinsäurelösung verdünnt. Davon wurde 1 ml mit 5 Tropfen Mayers Reagen versetzt, und 1 ml mit 2 ml Reagens nach van Urk.

4,12 Quantitative Alkaloidbestimmung.

4,121 Ausschüttelungsverfahren.

1,00 lufttrockenes Mycel wurden mit reinem Seesand fein verrieben. In einem Perkulationsröhrchen von 15 mm Durchmesser, das unten durch einen Schliffhahn verschlossen war, wurde das Pulver über eine Watteschicht geschichtet und mit 5 ml methanolisch-wässriger Weinsäurelösung 12 Stunden mazeriert. Nach Abtropfenlassen wurde dreimal mit je 5 ml methanolisch-wässriger Weinsäurelösung perkoliert. Die Auszüge wurden mit Ammoniak auf den P_H -Wert 8,0 gebracht und zweimal mit je 30 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die Methylenchloridphase wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit 1,0 ml Eisessig aufgenommen und mit 4,0 ml 1%-iger wässriger Weinsäurelösung verdünnt. Die meist trübe Lösung wurde mit 10 ml Petroläther ($Kp. 40-60^\circ$) geschüttelt und filtriert. Die Lösung wurde direkt, oder bei höheren Gehalten nach entsprechendem Verdünnen mit 1%-iger Weinsäurelösung, photometrisch bestimmt.

Zur quantitativen Alkaloidbestimmung im Kulturfiltrat diene die unter 4,111 beschriebene Lösung.

4,122 Weinsäuremethode.

100 mg feingemahlenes Mutterkorn wurden im Perkolationsröhrchen mit Petroläther (Kp. 40-60°) entfettet, und mit 10 ml 30%-iger wässriger Weinsäurelösung 4 Stunden unter Umrühren mit einem Glasstab mazeriert. Nach Abfiltrieren wurde der Gehalt direkt oder nach entsprechendem Verdünnen mit 1%-iger Weinsäurelösung, photometrisch bestimmt.

4,123 Photometrische Bestimmung.

2,0 ml der zu untersuchenden Lösung wurden mit 4,0 ml Reagens nach van Urk versetzt. Nach einer Entwicklungszeit von 15 Minuten wurde die Extinktion der Blaufärbung bei 1,00 cm Schichtdicke im Elko II (Zeiß) unter Verwendung von Filter S 57 gemessen. Die zugrundeliegende Eichkurve wurde mit lösungsmittelfreiem Ergotaminin aufgestellt. Im Extinktionsbereich von $E = 0,084$ bis $E = 0,721$ entspricht die Kurve dem Lambert-Beer'schen Gesetz, dieser Bereich entspricht 10 μ /ml bis 80 μ /ml. Die angegebenen Blauwerte stellen die der vorliegenden Alkaloidmenge äquivalente Menge an Ergotamin dar.

4,2 Papierchromatographische Bestimmung der Alkaloide.

4,21 Herstellung der Untersuchungslösungen.

4,211 Aus den Sklerotien.

100 mg feingemahlenes Mutterkorn wurden in einem Reagensglas durch zweimalige halbstündige Maceration mit 10 ml Petroläther (Kp. 40-60°) entfettet. Dann wurde mit 10 ml Methylenchlorid 30 Minuten extrahiert. Nach Abfiltrieren wurde das Methylenchlorid auf dem Wasserbad bis auf etwa 0,05 ml abgedampft. Die Lösung enthielt dann etwa 1 % Alkaloid.

4,212 Aus saprophytischen Mycelien und Kulturfiltraten.

Nach dem unter 4,121 beschriebenen Ausschüttelverfahren wurden aus 1,0 Trockenmycel Methylenchloridauszüge hergestellt, ebenso nach 4,111 aus 50 ml Kulturfiltrat. Die Methylenchloridauszüge

wurden auf dem Wasserbad bis auf etwa 0,05 ml eingeeengt, die Lösung war dann etwa 1%-ig.

4,213 Allgemeine Bereitung der Untersuchungslösungen.

Zur Untersuchung von Extrakten, Rohalkaloidgemischen und Reinalkaloiden wurden Lösungen in Methylenchlorid verwandt, die etwa 1 - 2 % Alkaloid enthielten.

4,22 Papierchromatographie nach K.Macek u. Mitarb. (57)

Papierbogen (Schleicher und Schüll 2043b) von 30 x 15 cm Größe wurden durch eine 40%-ige (V/V) Formamidlösung in Aceton gezogen und zum Abtropfen und Antrocknen 10 Minuten aufgehängt. Auf die 8 cm vom oberen Rand markierte Startlinie wurde die Untersuchungslösung mit einer Blutzuckerpipette in kleinen Anteilen aufgetragen. Die aufgetragene Menge betrug im Allgemeinen 1 - 2 mm², sie entsprach 20 - 30 µg. Daneben wurde eine Testlösung bekannter Reinalkaloide in gleicher Weise aufgetragen. Es wurde absteigend in einer Glaschromatographierkammer (Desaga) mit trockenem, formamidgesättigtem Benzol chromatographiert, durch eine auf dem Boden der Kammer stehende Schale mit 500 ml Benzol war deren Innenraum benzoldampfgesättigt. Die Laufzeit betrug 4 - 5 Stunden. Die Identifizierung erfolgte unter der UV-Analysenquarzlampe durch Vergleich der Rf-Werte mit denen der Reinalkaloide.

Zur Bestimmung der wasserlöslichen Alkaloidfraktion wurden die Bogen an der Luft getrocknet und in einer chloroformdampfgesättigten Chromatographierkammer absteigend mit formamidgesättigtem Chloroform entwickelt. Im Durchlaufchromatogramm über 15 Stunden wurde die wasserunlösliche Alkaloidfraktion eluiert. Die Identifizierung der wasserlöslichen Alkaloide erfolgte durch Vergleich ihrer Laufstrecken mit denen mitaufgetragener authentischer Reinalkaloide unter der Analysenquarzlampe.

4,3 Isolierung von Reinalkaloiden.

4,31 Isolierung von Ergotaminin aus Kulturen von Stamm WD 198.

Mit Stamm WD 198 wurden 200 Kolben mit Glycocoll-Nährlösung beimpft. Nach einer Kulturdauer von 38 Tagen wurden davon 164 Kolben, die durch kräftigen Wuchs und Violettfärbung zur weiteren

Aufarbeitung geeignet erschienen, abgeerntet und getrocknet. Das Trockengewicht der ersten 100 Mycelien betrug 200 g. Sie wurden mit einer Konduxmühle fein gemahlen und mit 500 ml weinsaurem Methanol einen Tag vorgequollen. Nach Abpressen wurde die Droge mit 2 Liter methanolisch-wässriger Weinsäurelösung perkoliert. Die Auszüge wurden mit Ammoniak auf den P_H -Wert 8,0 eingestellt und zweimal mit je 2,5 Liter Methylenchlorid 1/2 Stunde ausgerührt. Die Methylenchloridphase wurde im Vakuum auf 100,0 ml eingeengt und 1,0 ml zur Gehaltsbestimmung entnommen, er betrug 92,2 mg.

Die restlichen 64 Mycelien mit einem Trockengewicht von 165 g wurden feingemahlen und mit 900 ml Methylenchlorid eine halbe Stunde verrührt. Nach Filtration und Einengen wurde der Rückstand in 20 ml Methylenchlorid wieder aufgenommen. Diese Lösung wurde in 100 ml Petroläther zur Entfernung des Fettes eingerührt. Das ausgefallene Alkaloidgemisch wurde abzentrifugiert und zur Gehaltsbestimmung wieder in Methylenchlorid aufgenommen. Der Blauwert betrug 23,0 mg.

Die mit Methylenchlorid ausgerührten Mycelien wurden mit methanolisch-wässriger Weinsäurelösung perkoliert und wie oben beschrieben weiter aufgearbeitet. Diese zweite Extraktion ergab nochmals ein Rohalkaloidgemisch von 42 mg Blauwert.

Eine weitere Versuchsreihe von 120 Kolben wurde wie vorstehend beschrieben (Perkolatation mit methanolisch-wässriger Weinsäurelösung) aufgearbeitet, es wurde ein Rohalkaloidgemisch von 123 mg Blauwert erhalten.

Die Kulturfiltrate (5,2 + 4,5 l der ersten, und 7,2 l der zweiten Versuchsreihe) wurden mit Ammoniak auf den P_H -Wert 8,0 eingestellt und mit jeweils dem gleichen Volumen an Methylenchlorid eine halbe Stunde ausgerührt. Nach Trennung der Emulsion durch Zentrifugieren wurden die Methylenchloridphasen völlig eingeengt und im Rückstand der Alkaloidgehalt bestimmt. In der ersten Versuchsreihe wurde ein Rohalkaloidgemisch mit 63 mg Blauwert erhalten, in der zweiten ein solches mit 66,3 mg Blauwert.

Chromatographische Reinigung.

6,6 g Aluminiumoxyd nach Brockmann (Merck) wurden mit frisch destilliertem, trockenem Methylenchlorid in ein Perkulationsrohr von 10 mm Durchmesser und 200 mm Länge eingeschlämmt. Die in der ersten

Versuchsreihe erhaltenen 220 mg Rohalkaloid wurden in 5 ml Methylenchlorid warm gelöst und auf die Aluminiumoxydsäule aufgegeben. Es wurde mit frisch destilliertem, trockenem Methylenchlorid eluiert, und die im ultravioletten Licht blau fluoreszierenden Zonen fraktioniert aufgefangen. Das Eluat der ersten Zone war bräunlich gefärbt, es ergab mit dem Reagens nach van Urk und nach Mayer keine positive Reaktion. Das Eluat der zweiten Zone von 150 ml ergab eine positive Reaktion nach van Urk. Das Lösungsmittel wurde im Dunklen abgedunstet, der gelbe lackartige Rückstand von 320 mg ergab einen Blauwert von 185 mg. Er wurde mit 5 ml Methylenchlorid aufgenommen und mit 2 ml Methanol versetzt. Daraus kristallisierten fünfeckige Plättchen aus, die nach Isolierung und vorsichtigem Waschen mit Methanol einen Schmelzpunkt von 224°C (Koflerblock) unter Zersetzung aufwiesen.

Das Kristallgemisch und der Rückstand der Mutterlauge wurden wieder in 5 ml Methylenchlorid aufgenommen und an einer Säule von 30,0 g Aluminiumoxyd nach Brockmann in der gleichen Weise mit Methylenchlorid chromatographiert. Die erste blau fluoreszierende Zone ergab 50 ml Eluat mit einem Verdunstungsrückstand von 117 mg bei einem Blauwert von 110 mg. Davon wurde ein Teil in 5 ml Methylenchlorid gelöst und mit 2 ml Methanol versetzt. Das Ergotaminin kristallisierte in fünfeckigen Platten aus, die einen Schmelzpunkt von 231° (Koflerblock) unter Zersetzung aufwiesen. Ein anderer Teil wurde in 5 ml Methylenchlorid gelöst und 2 ml 90%-iges Aceton hinzugegeben. Die auskristallisierenden dreieckigen Tafeln zeigten einen Schmelzpunkt von 215° unter Zersetzung. Die spezifische Drehung der Substanz in Chloroform betrug $[\alpha]_D^{20} = +355^{\circ}$.

$$\alpha_D^{20} = +0,78^{\circ}, \quad d = 1,0 \text{ dm}, \quad c = 44\text{mg}/20 \text{ ml} = 0,22$$

Das Eluat der zweiten Zone von 100 ml ergab bei Abdunsten einen lackartigen Rückstand von 49 mg mit 43 mg Blauwert. Die Substanz konnte aus Methanol und Aceton nicht kristallin erhalten werden.

Das in der zweiten Versuchsreihe erhaltene Rohalkaloidgemisch von 189 mg Blauwert wurde mit Methylenchlorid über 4,0 g Aluminiumoxyd nach Brockmann chromatographiert. Das Eluat der ersten blau fluoreszierenden Zone ergab keine Reaktion mit dem Reagens nach van Urk und nach Mayer. Die zweite, ebenso fluoreszierende Zone wurde in einer Fraktion von 150 ml aufgefangen und ergab mit dem

Reagens nach van Urk eine Blaufärbung. Der Abdunstungsrückstand von 242 mg wies einen Blauwert von 150 mg auf. Bei Aufnahmen in 5 ml Methylenchlorid und Versetzen mit 2 ml Methanol kristallisierten fünfeckige Platten aus, die nach Waschen mit Methanol einen Schmelzpunkt von 220° (u. Zers.) zeigten.

Zur weiteren Auftrennung wurde das Kristallisat in 5 ml Methylenchlorid aufgenommen und an 25 g Aluminiumoxyd nach Brockmann mit Methylenchlorid chromatographiert. Die erste Fraktion von 50 ml ergab einen Rückstand von 113 mg mit 103 mg Blauwert. Kristallisation aus Methanol ergab fünfeckige Platten vom Schmelzpunkt 229° (u. Zers.). Aus 90%-igem Aceton kristallisierte das Ergotaminin in dreieckigen Plättchen vom Schmelzpunkt 224° (u. Zers.) aus. Die spezifische Drehung in Chloroform betrug $[\alpha]_D^{20} = +342^{\circ}$.

$$\alpha_D^{20} = +0,71^{\circ}, \quad d = 1,0 \text{ dm}, \quad c = 41,6 \text{ mg/20 ml} = 0,208$$

Die zweite blau fluoreszierende Zone wurde mit 100 ml Methylenchlorid eluiert, der lackartige Rückstand (27 mg) zeigte einen Blauwert von 23,3 mg. Mit Methanol oder Aceton konnte keine Kristallisation erzielt werden.

3,32 Ergometringewinnung aus saprophytischen Kulturen.

14 Tage alte Schrägagarkulturen des Klonstammes K 90 wurden 4 Wochen im Tiefkühlschrank bei -30°C aufbewahrt. Damit wurden 240 Kolben mit Glycocoll-Nährlösung beimpft. Nach einer Kulturdauer von 38 Tagen wiesen 176 starke Violettfärbung und gutes Mycelwachstum auf und wurden aufgearbeitet. Probeanalysen ergaben folgende Gehalte:

Versuchsnummer	Stamm	Nährboden	Kulturdauer	Mycelgewicht	Blauwert
1340/13	K 90	Glycocoll	38^d	2,7 g	2,6 mg
1340/14			38^d	1,5 g	2,0 mg
1340/15			38^d	2,7 g	6,2 mg
1340/16			38^d	2,6 g	4,0 mg
1340/17			38^d	2,8 g	1,9 mg
1240/18			38^d	2,7 g	3,7 mg

Die lufttrockenen Mycelien im Gesamtgewicht von 365 g wurden mit einem Liter methanolisch-wässriger Weinsäurelösung 12 Stunden vorgequollen und anschließend mit 2,5 Liter des gleichen Menstruums

perkoliert. Das Perkolat wurde im Vakuum auf 2 Liter eingeengt und mit 2 Liter Aether (pro narcosi) ausgeschüttelt. Ein Teil des fettigen, farbstoffhaltigen Rückstandes der Aetherphase wurde mit 1%-iger Weinsäurelösung bei 50°C 5 Minuten mazeriert, das wässrige Filtrat ergab keine Reaktion mit dem Reagens nach van Urk. Der wässrige Rückstand der Aetherausschüttelung wurde mit Ammoniak auf den Wert 8,0 eingestellt und zweimal mit je 2 Liter Methylenchlorid ausgerührt. Die Methylenchloridphasen wurden vereinigt und im Vakuum völlig eingeengt. Der Rückstand hatte einen Blauwert von 610 mg.

Das Kulturfiltrat (7 l) wurde mit Ammoniak auf den P_H -Wert 8,0 gebracht und mit 7 Liter Methylenchlorid ausgerührt und die Emulsion durch Zentrifugieren getrennt. Der Rückstand der Methylenchloridphase hatte einen Blauwert von 320 mg.

Chromatographische Reinigung.

Das Rohalkaloidgemisch des Mycels wurde in 10 ml Methylenchlorid gelöst und an einer Säule (10 mm $\varnothing$) von 20 g Aluminiumoxyd nach Brockmann mit Methylenchlorid chromatographiert. Die erste, im ultravioletten Licht blau, und die zweite, blaugrün fluoreszierende Zone wurde mit Methylenchlorid eluiert. Die blau fluoreszierende Zone am oberen Ende der Säule wurde mit Methylenchlorid eluiert, das 2 % Methanol enthielt. Danach wurde die Säule mit Methanol nachgewaschen.

In gleicher Weise wurde das aus dem Kulturfiltrat gewonnene Rohalkaloidgemisch an einer Säule von 10 g Aluminiumoxyd nach Brockmann chromatographiert.

Rohalkaloidgemisch des	Fraktion		Fluoreszenz	Elutionsmittel	Blauwert
	Menge	No.			
Mycels 610 mg	50 ml	1	blau	CH_2Cl_2	555 mg
	200 ml	2	blaugrün	CH_2Cl_2	68 mg
	200 ml	3	blau	$CH_2Cl_2 + CH_3OH$	16 mg
	200 ml	4	blau	CH_3OH	0 mg
Kulturfiltrats 320 mg	50 ml	1	blau	CH_2Cl_2	175 mg
	200 ml	2	blaugrün	CH_2Cl_2	22 mg
	200 ml	3	blau	$CH_2Cl_2 + CH_3OH$	17 mg
	200 ml	4	blau	CH_3OH	0 mg

Papierchromatographische Untersuchung der einzelnen Fraktionen nach K.Macek (57) ergab bei beiden Säulen:

1. Fraktion	2. Fraktion	3. Fraktion
Ergosin	Ergometrin	Ergometrin
Ergocristin	Ergosin	Ergosin
Ergocristinin	Ergocristin	
Ergokryptin	Ergocristinin	
	Ergokryptin	

Aus der zweiten Fraktion beider Säulen kristallisierten bei Abdunsten des Methylenchlorids feine Nadeln aus, die von der Mutterlauge abgetrennt wurden. Sie wurden aus je 10 ml Benzol umkristallisiert. Dabei wurden aus dem Myceleextrakt 31 mg, und aus dem Extrakt des Kulturfiltrates 14 mg erhalten. Die Nadeln wiesen einen Schmelzpunkt von 157 - 159° (Koflerblock) unter Zersetzung auf. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Ergometrin lag bei 156 - 157°. Die spezifische Drehung in Wasser betrug $[\alpha]_D^{20} = +89^\circ$.

$$\alpha_D^{20} = 0,16^\circ, \quad d = 1,0 \text{ dm}, \quad c = 0,18$$

Bei der Papierchromatographie der Base nach K.Macek (57) verblieb die Substanz bei Entwicklung mit Benzol auf dem Startfleck. Im Durchlaufchromatogramm mit Chloroform zeigte der im ultravioletten Licht blau fluoreszierende Flecken nach 15 Stunden die gleiche Laufstrecke wie mitchromatographiertes authentisches Ergometrin.

Zur Darstellung des Chlorhydrates wurden 5 mg der Substanz in 5 ml Aethanol gelöst und mit 1,6 ml 0,01 n-alkoholischer Salzsäure versetzt. Bei 0°C kristallisierten nach fünf Tagen spitze, wetzsteinförmige Nadeln aus. Die Kristallform stimmte mit der des auf gleiche Weise aus authentischem Ergometrin hergestellten Chlorhydrates überein.

5. Untersuchte Claviceps-Stämme.

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Claviceps-Stämme wurden jeweils auf den folgenden fünf Nährböden kultiviert:

Stamm	Wirtspflanze	Fundort	Jahr	Alkaloidgehalt paras. Sam. Boden
R 77	<i>Agropyrum repens</i>	Hunsrück	1952	pos.
R 87	<i>Dactylis glomerata</i>	"	1952	pos.
El	<i>Elymus europaeus</i>	Wertach	1952	0,47 % 0,87 G 0,6 As
Br	<i>Bromus erectus</i>	"	1952	pos.
Fe/Te	<i>Festuca elatior</i>	Tegernsee	1952	0,10 % 1,05 G 0,30 As
A.C.	<i>Agrostis canina</i>	Ammertal	1952	pos. 0,02 Ab
Lol.T	<i>Lolium perenne</i>	Taunus	1952	0,38 %
Lo.T.	<i>Lolium perenne</i>	Taunus	1953	0,29 %
Mol.T	<i>Molinia coerulea</i>	"	1952	1,05 % 0,7 P 0,54 As
Ho.W	<i>Holcus</i>	Wertach	1952	pos. 0,26 Ab
Mol 12	<i>Molinia coerulea</i>	Gemen	1953	1,25 % 0,63 P
Mol 13	" "	"	1953	1,25 %
Mol 15	" "	"	1953	1,25 %
Mol 16	" "	"	1953	1,25 % 2,02 P
Mol 16a	" "	"	1953	1,25 %
Mol 18	" "	"	1953	1,25 %
Mol 19	" "	"	1953	1,25 %
Mol 20	" "	"	1953	1,25 % 0,17 Ab
GW 2/21	<i>Hordeum sativum</i>	Wertach	1951	2,24 %
Col 1	" "	Columbien	1953	pos.
Col 2	" "	"	1953	pos.
Col 5	" "	"	1953	pos.
Col 6	" "	"	1953	pos.
Col 8	" "	"	1953	pos.
Col 9	" "	"	1953	pos. 0,72 G 0,91 As
5/1Wz	<i>Triticum vulgare</i>	Mainz	1954	1,51 %
5/4Wz	" "	"	1954	1,41 %
5/5Wz	" "	"	1954	1,57 %
5/6Wz	" "	"	1954	1,55 %
66/3	<i>Secale cereale</i>	"	1952	0,84 % 0,73 G
R/T	" "	Taunus	1953	0,32 %
Po 12	" "	Portugal	1952	0,31 %
Po 19/1	" "	"	1952	0,93 %
DR 017	" "	Reinheim	1952	0,85 %
DR 082	" "	"	1952	0,92 %

tamm	Wirtspflanze	Fundort	Jahr	Alkaloidgehalt	
				paras.	Sapr. Boden
r 226	Secale cereale	Bretzenheim	1952	1,42 %	
M 036	" "	Mainz	1953	0,87 %	
9 E	" "	Elsheim	1951	1,23 %	
3 St	" "	Steig	1952	1,06 %	
001	" "	Ungarn	1953	1,55 %	
004	" "	"	1953	0,89 %	
006	" "	"	1953	0,88 %	
009	" "	"	1953	1,02 %	0,93 G 0,14 Ab
a 10	" "	Schweiz	1954	0,86 %	0,36 As
a 11	" "	"	1954	0,84 %	
a 13	" "	"	1954	0,93 %	
a 19	" "	"	1954	0,92 %	
a 21	" "	"	1954	0,90 %	
a 26	" "	"	1954	0,91 %	
a 28	" "	"	1954	0,85 %	
a 34	" "	"	1954	0,86 %	
a 39	" "	"	1954	0,84 %	
a 41	" "	"	1954	0,84 %	
a 44	" "	"	1954	0,87 %	
081	" "	Mainz, Anbau	1954	1,65 %	0,21 G
128	" "	"	1954	1,65 %	0,22 G
160	" "	"	1954	1,58 %	0,23 G
161	" "	"	1954	1,64 %	
194	" "	"	1954	1,48 %	
014	" "	Ungarn	1953	1,13 %	1,34 G 0,8 As
015	" "	"	1953	1,01 %	
016	" "	"	1953	1,04 %	
018	" "	"	1953	0,96 %	
019	" "	"	1953	0,95 %	
024	" "	"	1953	1,12 %	
029	" "	"	1953	0,96 %	
035	" "	"	1935	1,25 %	
047	" "	"	1953	1,08 %	
056	" "	"	1953	1,08 %	
060	" "	"	1953	1,05 %	0,30 G 0,42 As
067	" "	"	1953	1,09 %	

Stamm	Wirtspflanze	Fundort	Jahr	Alkaloidgehalt	
				paras.	sapr. Boden
M 5001	Secale cereale	Handelsdroge	1954	0,74 %	1,14 G 0,3
M 5000	" "	"	1954	0,40 %	
M 4001	" "	"	1954	0,44 %	
M 4007	" "	"	1954	0,44 %	
M 4004	" "	"	1954	0,44 %	
M 4005	" "	"	1954	0,44 %	
M 4006	" "	"	1954	0,44 %	
M 4009	" "	"	1954	0,44 %	
M 4010	" "	"	1954	0,44 %	
WD 002	" "	Füssen	1952	pos.	
WD 003	" "	"	1952	pos.	
WD 004	" "	"	1952	pos.	
WD 005	" "	"	1952	pos.	
WD 006	" "	"	1952	0,63 %	0,72 G
WD 007	" "	"	1952	0,96 %	
WD 008	" "	"	1952	pos.	
WD 012	" "	"	1952	pos.	
WD 013	" "	"	1952	pos.	
WD 015	" "	"	1952	pos.	
WD 016	" "	"	1952	pos.	
WD 018	" "	"	1952	0,75 %	0,21 G
WD 019	" "	"	1952	pos.	
WD 020	" "	"	1952	0,81 %	0,40 G
WD 021	" "	"	1952	pos.	
WD 022	" "	"	1952	pos.	
WD 023	" "	"	1952	0,51 %	
WD 025	" "	"	1952	pos.	
WD 026	" "	"	1952	pos.	
WD 028	" "	"	1952	pos.	
WD 029	" "	"	1952	pos.	
WD 030	" "	"	1952	pos.	
WD 091	" "	Kempten	1952	0,87 %	0,99 G
WD 122	" "	"	1952	0,88 %	
WD 130	" "	"	1952	0,85 %	
WD 132	" "	"	1952	0,86 %	
WD 159	" "	"	1952	0,89 %	

Stamm	Wirtspflanze	Fundort	Jahr	Alkaloidgehalt	
				paras.	sapr. Boden
WD 163	Secale cereale	Kempton	1952	0,81 %	
WD 198	" "	Lechbruck	1952	0,89 %	9,72 G
WD 211	" "	"	1952	0,92 %	
WD 220	" "	"	1952	0,83 %	
WD 230	" "	"	1952	0,86 %	
WD 232	" "	"	1952	0,89 %	
WD 246	" "	"	1952	1,19 %	0,83 G
WD 279	" "	Füssen	1952	0,81 %	
WD 281	" "	"	1952	0,91 %	
WD 286	" "	"	1952	0,80 %	
WD 300	" "	"	1952	0,82 %	
WD 310	" "	"	1952	0,84 %	0,17 G
WD 347	" "	"	1952	1,01 %	
WD 381	" "	"	1952	1,01 %	
WD 401	" "	"	1952	1,03 %	
WD 407	" "	"	1952	1,05 %	
WD 444	" "	"	1952	1,23 %	
WD 452	" "	"	1952	0,85 %	1,77 G
WD 457	" "	"	1952	0,88 %	0,41 G
WD 467	" "	"	1952	0,86 %	0,16 G
WD 545	" "	Kempton	1952	0,86 %	
WD 551	" "	"	1952	0,86 %	
WD 576	" "	"	1952	0,94 %	0,40 G
WD 620	" "	"	1952	0,80 %	0,29 G
WD 643	" "	"	1952	0,83 %	
WD 669	" "	"	1952	0,91 %	
WD 670	" "	"	1952	1,04 %	
WD 688	" "	"	1952	1,09 %	0,76 G
WD 707	" "	"	1952	0,85 %	
WD 723	" "	"	1952	0,94 %	
WD 736	" "	Lechbruck	1952	0,99 %	0,58 G
WD 739	" "	"	1952	0,92 %	
WD 744	" "	"	1952	0,82 %	
WD 746	" "	"	1952	0,91 %	
WD 770	" "	"	1952	0,89 %	
WD 771	" "	"	1952	0,84 %	1,18 G

Stamm	Wirtspflanze	Fundort	Jahr	Alkaloidgehalt	
				paras.	sapr. Boden
WD 794	Secale cereale	Lechbruck	1952	0,85 %	
WD 802	" "	"	1952	0,90 %	
WD 805	" "	"	1952	0,93 %	
WD 806	" "	"	1952	1,04 %	
WD 908	" "	"	1952	0,80 %	
WD 1031	" "	Roßhaupten	1954	0,81 %	
WD 1086	" "	"	1954	0,87 %	
WD 1111	" "	"	1954	0,79 %	
WD 1209	" "	"	1954	0,86 %	
WD 1284	" "	"	1954	0,89 %	
WD 1350	" "	"	1954	0,83 %	1,17 G
WD 1377	" "	"	1954	0,72 %	
WD 1422	" "	"	1954	0,92 %	
WL 1429	" "	"	1954	0,73 %	
WD 1487	" "	"	1954	0,87 %	1,19 G
WD 1509	" "	"	1954	0,76 %	
WL 1517	" "	"	1954	0,78 %	0,77 G
WL 1561	" "	"	1954	0,80 %	
WL 1608	" "	"	1954	0,79 %	1,70 G
WD 1721	" "	"	1954	0,70 %	
WD 1733	" "	"	1954	0,74 %	
WD 1767	" "	"	1954	0,70 %	
W1 002	" "	Wicker	1954	0,85 %	0,95 G
WT 004	" "	"	1954	0,61 %	0,16 G
W1 005	" "	"	1954	0,80 %	1,71 G
W1 006	" "	"	1954	0,79 %	
WT 007	" "	"	1954	0,61 %	
WT 011	" "	"	1954	0,55 %	
WT 016	" "	"	1954	0,60 %	
WTC 021	" "	"	1954	0,94 %	1,07 G
WTC 028	" "	"	1954	1,35 %	2,28 G
WT 029	" "	"	1954	0,53 %	
WTC 030	" "	"	1954	1,37 %	0,64 G
W1 031	" "	"	1954	0,95 %	1,39 G
W1 033	" "	"	1954	0,97 %	3,15 G
W1 039	" "	"	1954	0,83 %	0,31 G

Stamm	Wirtspflanze	Fundort	Jahr	Alkaloidgehalt	
				paras.	sapr.
WT 040	Secale cereale	Wicker	1954	0,61 %	
W1 041	" "	"	1954	0,91 %	2,76 G
W1 042	" "	"	1954	0,94 %	1,57 G
WT 045	" "	"	1954	0,66 %	0,45 G
W1 046	" "	"	1954	0,68 %	
WTC 049	" "	"	1954	1,33 %	0,19 G
WT 050	" "	"	1954	0,68 %	
WT 053	" "	"	1954	0,47 %	
W1 057	" "	"	1954	0,85 %	3,09 G
W1 060	" "	"	1954	0,88 %	1,40 G
WT 067	" "	"	1954	0,58 %	1,65 G
WTC 073	" "	"	1954	1,33 %	
WTC 081	" "	"	1954	1,34 %	0,12 G
W1 082	" "	"	1954	0,67 %	
WT 092	" "	"	1954	0,68 %	
WT 100	" "	"	1954	0,72 %	
WT 106	" "	"	1954	0,80 %	
WT 117	" "	"	1954	0,87 %	1,69 G
W1 121	" "	"	1954	0,72 %	0,45 G
WT 123	" "	"	1954	0,57 %	

K = Nährlösung nach H.Kirchhoff	(3,211)
P = Pepton-Nährlösung	(3,212)
As = Asparagin-Nährlösung	(3,213)
Ab = Ammoniumsuccinat-Mannit-Nährlösung	(3,214)
G = Glycocoll-Nährlösung	(3,215)

Bei den alkaloidbildenden Stämmen ist neben dem (abgekürzten) Nährboden der Durchschnittsgehalt aus 6 Kolben in mg angegeben.

6. Einwirkung von Reizen.

6,1 Temperatureinwirkung.

Allgemeine Technik.

Die zu den Kältepassagen verwandten Reagensglaskulturen mit Pepton-Agar oder Glycocoll-Agar wurden zunächst 4 Wochen nach Beimpfung bei 20° aufbewahrt. Dann wurden sie unter einem Glassturz als Tropfwasser- bzw. Regenschutz der jeweiligen Kälteinwirkung unterworfen. Mit ihnen wurden Glycocoll-Nährlösungen beimpft. Die Kontrollkulturen mit gleichem Nährboden wurden mit unbehandelten, gleichaltrigen Schrägagarkulturen beimpft.

6,11 Einwirkung von Außentemperaturen im Frühjahr.

Stamm	Dauer der Einwirkung	Temperatur	Schrägagar	Gehalt der Glycocoll-Kulturen	
				mit Kälteeinwirkung	ohne Kälteeinwirkung
E1	16.3. bis 1.5.1955	-5° bis +10°	Glycocoll	0,25 mg	0,87 mg
Col 9				0,0 mg	0,72 mg
Fe/Te				0,71 mg	1,05 mg
Fe/Te 1954				6,8 mg	1,75 mg
66/3				0,0 mg	0,73 mg
WD 006				0,0 mg	0,74 mg
WD 018				0,0 mg	0,21 mg
WD 198				10,7 mg	1,74 mg
WD 246				0,72 mg	0,83 mg

6,12 Einwirkung von Außentemperaturen im Herbst.

Stamm	Dauer der Einwirkung	Temperatur	Schrägagar	Gehalt der Glycocoll-Kulturen	
				mit Kälteeinwirkung	ohne Kälteeinwirkung
WD 198	11.10. bis	-5°	Pepton	0,0	1,0 mg
WD 198	20.12.55	bis +10°	Glyc.	0,0	1,0 mg

6,13 Aufbewahrung im Kühlschrank.

Stamm	Dauer der Einwirkung	Temperatur	Schrägagar	Gehalt der Glycocoll-Kulturen	
				mit Kälteeinwirkung	ohne Kälteeinwirkung
WD 198	11.10. bis	0°	Pepton	1,8 mg	1,05 mg
Fe/Te 1954	20.12.1955		Pepton	6,5 mg	1,75 mg

6,14 Aufbewahrung im Tiefkühlschrank.

Stamm	Dauer	Temperatur	Schrägagar	Alkaloidgehalt der Glycocoll-Kulturen	
				mit Kälteeinwirkung	ohne Kälteeinwirkung
WD 198	14 ^d	-30°	Pepton	0,57 mg	1,74 mg
WD 198	14 ^d	-30°	Glyc.	0,46 mg	-
WD 198	30 ^d	-30°	Pepton	0,23 mg	1,05 mg
Fe/Te 1954	30 ^d	-30°	Pepton	3,49 mg	1,75 mg
Fe/Te 1954	30 ^d	-30°	Glyc.	3,95 mg	-

6,2 Parasitische Zwischenpassagen.

Von je einer Schrägagarkultur der in Tabelle 15 angeführten Stämme wurden 20 Schrägagarkulturen abgeimpft. 10 dieser Kulturen dienten zur Beimpfung von je 50 Kolbenkulturen mit Glycocoll-Nährlösung. Von den restlichen 10 Röhrchen wurden mit 1 Liter Wasser die Konidien abgeschwemmt. Mit Hilfe einer Handimpfung

nach dem Nadelwalzenprinzip wurden mit diesen Konidienaufschwemmungen je eine Roggenparzelle von 1 ar Größe im Frühjahr 1955 beimpft. Im Juli wurden von jedem Feld etwa 1 kg Mutterkorn geerntet. Der Gehalt der Sklerotien wurde nach der Weinsäuremethode bestimmt (4,121), die einzelnen Alkaloide papierchromatographisch nach K.Macek (57) ermittelt.

Aus einigen Sklerotien eines jeden Stammes wurden wieder saprophytische Schrägagarkulturen angelegt, und damit Glycocoll-Flüssigkulturen beimpft. Deren Alkaloidgehalt wurde nach dem unter 4,121 beschriebenen Verfahren bestimmt.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) L.R.Tulasne: Ann.Scienc.Nat. 3^es. 20, 5, 1853
- 2) O.Brefeld: Unters.Gesamtgebiet der Mycologie 10, 193, 1891
- 3) B.Meyer: Landw.Jahrbuch 17, 924, 1888
- 4) C.Engelke: Beiblatt Hedwigia 51, 221, 1902
- 5) W.W.Bonns: Am.Journ.Bot. 9, 339, 1922
- 6) L.Hecke: Schweiz.Apoth.Ztg. 60, 45, 1922
- 7) R.Falck: Pharm.Ztg. 67, 777, 1922
- 8) H.Kirchhoff: Zentralbl.f.Bakt. II, 310, 1929
- 9) H.Kreitmair u. W.Küssner: Biochem.Ztschr. 239, 189, 1931
- 10) A.McCrea: Am.Journ.Bot. 18, 50, 1931
- 11) R.Jaretsky: Arch.Pharm. 273, 348, 1935
- 12) G.Krebs: Dissert. ETH Zürich 1936
- 13) G.Schweizer: Phytopath.Ztschr. 13, 317, 1941
- 14) S.J.Ritzema: Dissert. Groningen 1943
- 15) J.de Tempe: Dissert.Amsterdam. 1945
- 16) E.Baldacci: Farmaco sci. e tec. 1, 110, 1946
- 17) H.D.Michener u. N.Snell: Am.Journ.Bot. 37, 52, 1950
- 18) K.Ogiu u. H.Shimamotu: Jap.Journ.Pharmacol. 1, 35, 1951
- 19) S.K.Sim u. H.W.Youngken: J.Am.Pharm.Assoc. 40, 434, 1951
- 20) M.Chaduc-Vialard: Thèse Strasbourg 1952
- 21) V.E.Tyler u. A.E.Schwarting: J.Am.Pharm.Assoc. 41, 590, 1952
- 22) L.Niedermaier: Dissert. Erlangen 1953
- 23) V.E.Tyler u. A.E.Schwarting: Science 118, 132, 1953
- 24) A.G.Paul, W.J.Kelleher u. A.E.Schwarting:
J.Am.Pharm.Assoc. 43, 205, 1954
- 25) S.K.Sim u. H.W.Youngken: J.Am.Pharm.Assoc. 43, 429, 1954
- 26) V.E.Tyler u. A.E.Schwarting: J.Am.Pharm.Assoc. 43, 207, 1954
- 27) M.L.Berman u. H.W.Youngken: J.Am.Pharm.Assoc. 43, 201, 1954
- 28) R.Stauber: Thèse Paris 1955
- 29) E.Thielmann: Dissert. Stuttgart 1955
- 30) G.Gjerstad u. E.Ramstad: J.Am.Pharm.Assoc. 44, 737, 1955
- 31) H.Rochelmeyer: D.A.Z. 94, 1. 1954
- 32) H.Raßbach: Dissert. Mainz 1955
- 33) H.Raßbach, K.G.Büchel u. H.Rochelmeyer: Arzneim.Forsch.
6, 690, 1956
- 34) M.Abe: Takeda Research Report 10, 73-233, 1951

- 35) M.Abe: J.Agr.Chem.Soc.Jap. 21, 29, 1947
Takeda Report 10, 129, 1951
- 36) M.Abe: J.Agr.Chem.Soc.Jap. 22, 2, 1948
Takeda Report 10, 145, 1954
- 37) M.Abe: J.Agr.Chem.Soc.Jap. 22, 61, 1948
Takeda Report 10, 162, 1951
- 38) M.Abe: J.Agr.Chem.Soc.Jap. 22, 85, 1948
Takeda Report 10, 171, 1951
- 39) M.Abe, T.Yamano, Y.Kozu u. M.Kusumoto:
J.Agr.Chem.Soc. 25, 458, 1951
- 40) M.Abe, T.Yamano, Y.Kozu u. M.Kusumoto:
J.Agr.Chem.Soc.Jap. 27, 18, 1953
- 41) M.Abe, T.Yamano u. M.Kusumoto:
J.Agr.Chem.Soc.Jap. 27, 613, 1953
- 42) M.Abe, T.Yamano u. M.Kusumoto:
J.Agr.Chem.Soc.Jap. 27, 617, 1953
- 43) M.Abe: J.Agr.Chem.Soc.Jap. 28, 1, 1954
- 44) M.Abe u. S.Yamatodani: J.Agr.Chem.Soc.Jap. 28, 501, 1954
- 45) M.Abe, T.Yamano, Y.Kozu u. M.Kusumoto:
J.Agr.Chem.Soc.Jap. 29, 697, 1955
- 46) M.Abe, S.Yamatodani, T.Yamano u. M.Kusumoto:
Bull.Agr.Chem.Soc.Jap. 19, 92, 1955
- 47) M.Abe u. S.Yamatodani:
Bull.Agr.Chem.Soc.Jap. 19, 94, 1955
- 48) M.Abe u. S.Yamatodani:
Bull.Agr.Chem.Soc.Jap. 19, 95, 1955
- 49) M.Abe u. S.Yamatodani:
Bull.Agr.Chem.Soc.Jap. 19, 161, 1955
- 50) M.Abe, S.Yamatodani, T.Yamano u. M.Kusumoto:
Bull.Agr.Chem.Soc.Jap. 20, 59, 1956
- 51) M.Abe u. S.Yamatodani:
Bull.Agr.Chem.Soc.Jap. 20, 95, 1956
- 52) A.Stoll, A.Brack, H.Kobel, A.Hofmann u. R.Brunner:
Helv.Chim.Act. 37, 1815, 1954
- 53) A.Stoll, A.Hofmann u. R.Brunner: Ang.Chem. 66, 748, 1954
- 54) K.Konrad: Dissert. Mainz 1952
- 55) R.Meinicke: Flora 143, 395, 1956
- 56) H.W. van Urk: Pharm. Weekbl. 66, 473, 1929

- 57) K.Macek, A.Cerny u. M. Semonsky: Pharmazie 9, 389, 1954
- 58) G.Kessler: Dissert. Mainz 1954
- 59) E.Abderhalden: Ztschr.physiol.Chem. 44, 276, 1905
- 60) A.Rippel-Baldes: Grundriß der Mikrobiologie, 3.Aufl. 1955
Berlin-Göttingen-Heidelberg, pag. 102
- 61) A.Rippel-Baldes: ibid., pag. 161
- 62) S.Edlbacher u. F.Leuthardt: Lehrbuch der physiol.Chemie,
11.Aufl. Berlin 1954. pag. 730
- 63) G.Beadle u. E.Tatum: Am.Journ.Bot. 32, 678, 1945
- 64) D.R.Hoagland: Bot.Rev. 3, 307, 1937
- 65) Ph.Lasseur: Trav.Labor.Microbiol.Fac.Pharmacie Nancy,
3, 53, 1930; 4, 31, 1931
- 66) E.G.Mulder: Arch.Mikrobiol. 10, 72, 1939
- 67) H.Burström: Planta 29, 292, 1939; 30, 129, 1940
- 68) J.Charney et al.: J.Bact. 62, 145, 1951
- 69) H.Eberhard: Dissert. TH München 1940
- 70) J.Schwalbold u. G.Nagel: Vorratspflege u. Lebensmittel-
forsch. 2, 231, 1939
- 71) A.Nason: Journ.Biol.Chem. 188, 397, 1951
- 72) K.Lohmann u. A.J.Kossel: Naturw. 27, 595, 1939
- 73) J.Fischer: Planta 32, 395, 1942
- 74) H.Bortels: Biochem.Ztschr. 182, 301, 1927
- 75) W.Schropp u. B.Arenz: Bodenkunde u. Pflanzenernährung
16, 169, 1940
- 76) E.Brandenburg: Phytopathol.Ztschr. 12, 1, 1939
- 77) H.Bortels: Arch.Mikrobiol. 1, 333, 1930; 11, 155, 1940
- 78) D.J.D.Nicholas: J.Biol.Chem. 207, 341, 1954
- 79) G.Gorbach u. O.G.Koch: Arch.Mikrobiol. 23, 284, 1955
- 80) S.Fränkell u. J.Rainer: Bioch.Ztschr. 74, 167, 1916
- 81) E.E. van Tamelen: Experientia 9, 458, 1953
- 82) E.Graf u. E.Neuhoff: Arzneim.Forsch. 4, 397, 1954
- 83) R.Stäger: Bot.Ztg. 6/7, 111, 1903
- 84) V.Grasso: Le Cladiceps delle Graminacee Italiane.
Estratto dagli Annali della Sperimentazione
Agraria. Rom 1952
- 85) N.v.Bekeasy: Phytopathol.Ztschr. 26, 49, 1956
- 86) E.Ramstad u. G.Gjerstad: J.Am.Pharm.Assoc. 44, 741, 1955
- 87) M.Hecht u. W.Hecht: Pharmazie 9, 424, 1954

- 88) L.Fuchs u. M.Pöhm: Scient.Pharm. 21, 239, 1953
- 89) M.Jung, E.Stahl, H.Rochelmeyer: Naturwiss. 44, 95, 1957
- 90) A.Stoll, J.Renz u. A.Brack: Helv.Chim.Act. 35, 2023, 1952
- 91) Th.M.v.Fellenberg: Mitt.Lebensmittelunters. 4, 248, 1913

L e b e n s l a u f

Am 26. März 1926 wurde ich als Sohn des Justizoberinspektors Paul Büchel und seiner Ehefrau Käthe, geb. Heidtmann in Homberg-Niederrhein geboren. Ich besuchte von Ostern 1932 bis 1936 die Volksschule an der Feldstraße in Homberg, und von Ostern 1936 an das Gymnasium Adolfinum zu Moers, das ich Januar 1944 nach halbjährigem Einsatz als Luftwaffen-helfer mit dem Hochschulreifezeugnis verließ. Nach Ableistung meiner Arbeitsdienst- und Militärdienstpflicht kehrte ich Juli 1945 aus der Kriegsgefangenschaft zurück. April 1946 legte ich nach einem Sonderlehrgang am Gymnasium Adolfinum zu Moers die Reifeprüfung ab. Nach zweijähriger Tätigkeit als Apothekenlaborant begann ich April 1948 die Ausbildung als Apothekerlehrling in der Phoenixapotheke in Homberg und legte März 1950 die Pharmazeutische Vorprüfung in Düsseldorf ab. Von Sommersemester 1950 ab studierte ich Pharmazie an der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz und bestand dort Sommersemester 1953 die Pharmazeutische Prüfung. Im Wintersemester 1953/54 begann ich mit der Bearbeitung des vorliegenden Themas. Gleichzeitig erhielt ich am Pharmazeutischen Institut der Universität Mainz eine Hilfsassistentenstelle, und wurde am 1.11.54 mit der Verwaltung der Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten betraut. Die Bestallung als Apotheker wurde mir zum 1.5.1954 erteilt.

